Untersuchungen zur Spaltung des Kollagens mit Bromcyan

Wolfhard Bandlow

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0109

Untersuchungen zur Spaltung des Kollagens mit Bromcyan

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt
von
Wolfhard Bandlow
aus
Wesermünde

München
1968

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Graßmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.1968

Meiner lieben Frau

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1965 bis Februar 1968 am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. W. Graßmann

bin ich für die Themastellung und für die finanzielle Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

An dieser Stelle möchte ich ferner alle Mitarbeiter des Institutes erwähnen, die mir jederzeit bereitwillig mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders danke ich herzlich

Herrn Dr. A. Nordwig

für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Gruppe und sein Interesse an dieser Arbeit.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Besonderen Dank sage ich meiner Frau Hildegard für ihre Geduld und ihre unermüdliche Hilfe während der Jahre der Promotion und für ihre Mühe bei der Anfertigung des Manuskriptes dieser Dissertation.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Verzeichnis der Abkürzungen	8
1.	Einleitung	
1.1.	Kollagen	11
1.1.1.	Quartärstruktur	11
1.1.2.	Sekundär- und Tertiärstruktur	13
1.1.3.	Primärstruktur	16
1.2.	Nichtenzymatische Spaltungsreaktionen	17
1.2.1.	Die Methioninspaltung mit Bromcyan	20
1.3.	Aufgabenstellung	23
2.	Ergebnisse	
2.1.	Versuche zur Auftrennung von Kollagenabbaupeptiden	25
2.1.1.	Die Bromcyanspaltung	25
2.1.2.	Versuche zur Vortrennung des Peptidgemisches	27
2.1.2.1.	Vortrennung auf der Grundlage der Unterschiede in der Molekülgröße	27
2.1.2.2.	Ausnutzung von Unterschieden im Ladungsmuster	27
2.1.3.	Weitere Trennung der erhaltenen Peptidfraktionen	32
2.1.4.	Untersuchungen über die Zahl der bei der CNBr-Spaltung entstehenden Bruchstücke ...	35
2.2.	Kinetische Verfolgung der Spaltungsreaktion mit CNBr	40
2.2.1.	Spaltungsversuche bei erhöhter Temperatur nach Wärmedenaturierung des Kollagens	41
2.2.2.	Spaltungsversuche in Trifluoressigsäure nach Wärmedenaturierung des Kollagens	48

		Seite
2.2.3.	Spaltungsversuche bei Raumtemperatur nach Salzdenaturierung des Kollagens	51
2.2.4.	Prüfung der als optimal ermittelten Spaltungsbedingungen	57
2.3.	Salzdenaturierungen	62
2.4.	Analytisches	74
2.4.1.	Trennungen an Sephadex	74
2.4.2.	Die Discelektrophorese	77
2.4.3.	Aminosäureanalytik	79
2.4.3.1.	Die Totalhydrolyse	79
2.4.3.2.	Analysen mit dem Aminosäureanalysator "Aminomat"	81
2.4.3.3.	Analysen mit dem Aminosäureanalysator BC 200 ("Biochrom")	81
3.	D i s k u s s i o n d e r E r g e b n i s s e	
3.1.	Die unspezifische Spaltung	85
3.2.	Die Spaltung mit Bromcyan	89
3.2.1.	Der pH-Effekt	91
3.2.2.	Der Salzeffekt	100
3.3.	Die Salzdenaturierung	103
4.	E x p e r i m e n t e l l e r T e i l	
4.1.	Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie	111
4.2.	Beschreibung der Versuche	112
	Versuch 1: Die Bromcyanspaltung	112
	Versuch 2: Die Dialyse	114
	Versuch 3: Die Sephadexchromatographie .	114
	Versuch 4: Trennung an CM-Sephadex	116
	Versuch 5: Die Trägerfreie Elektrophorese (VaP II)	116

Seite

Versuch 6: Die Discelektrophorese 117
Versuch 7: Aminosäureanalyse mit dem Analysator BC 200 der Fa. Bio-Cal Instrument 119
Versuch 8: Die Endgruppenanfärbung mit Ninhydrin 121
Versuch 9: Die Hydroxyprolinbestimmung . 121
Versuch 10: Die Dinitrophenylierung 122
Versuch 11: Die Hydrazinolyse 123
Versuch 12: Die Salzdenaturierung 123

5. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s 125

6. Z u s a m m e n f a s s u n g 133

Lebenslauf

Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen und Konstanten.

Bis	=	N,N'- Methylen - bis - acrylamid
c	=	Konzentration
c_m	=	Denaturierungskonzentration
c_m^o	=	Denaturierungskonzentration in 1 m H_3O^+- Ionen-Lösung (pH 0)
CM	=	Carboxymethyl
DANSyl	=	Dimethylamino-naphthyl-sulfonylrest
DNFB	=	2.4-Dinitrofluorbenzol
DNP	=	2.4-Dinitrophenylrest
ε	=	Extinktion
Gu	=	Guanidinium-(salze)
Ha	=	Harnstoff
I	=	Ionenstärke
$\varkappa$	=	Leitfähigkeit $\left[\Omega^{-1} \cdot cm^{-1}\right]$
K	=	Denaturierungskonstante (bei Wärme- bzw. Salzdenaturierung von Kollagen)
K'	=	pH-Abhängigkeitskonstante (bei Wärme- bzw. Salzdenaturierung von Kollagen)
K_a	=	Dissoziationskonstante für die Reaktion $HB \rightleftharpoons H^+ + :B^-$
k_1	=	Reaktionskonstante für die Reaktion 1. Ordnung
Mol%	=	Aminosäurereste pro 100 Reste
mu	=	Millimikron
NBS	=	N-Bromsuccinimid
pK_a	=	Negativer Logarithmus der Dissoziationskonstanten K_a für die Reaktion $HB \rightleftharpoons H^+ + :B^-$
s	=	Gleichgewichtskonstante für den Propagationsschritt, d.h. für die Angliederung eines helicalen Bausteins eines Proteins an ein vorhandenes helicales Segment, also für die Reaktion: -h-h-h-c-c-c-⇌-h-h-h-h-c-c-
θ	=	Umwandlungsgrad beim Denaturierungsvorgang
Temed	=	N,N,N',N' -Tetramethyläthylendiamin
TFA	=	Trifluoressigsäure

T_m	=	Denaturierungstemperatur (bei Wärme- bzw. Salzdenaturierung von Kollagen)
T_m^o	=	Denaturierungstemperatur für Kollagen bei salzfreiem Medium
Tris	=	Trishydroxymethylaminomethan
ug	=	Mikrogramm
uMol	=	Mikromol

1. Einleitung

1.1. Kollagen.*

Als faseriger Bestandteil der Haut, der Stützgewebe und der Sehnen, sowie des organischen Anteils der Zähne und der Knochen ist das Kollagen das mengenmäßig vorherrschende und am weitesten verbreitete Protein der Wirbeltiere. Es scheint darüber hinaus allen vielzelligen Organismen eigen zu sein, denn es kann auch aus Invertebraten sehr tiefer Entwicklungsstufen isoliert werden.

Das Kollagenmolekül ist nicht physiologisch wirksam. Es besitzt jedoch sehr charakteristische Eigenschaften, die seine Erforschung interessant und reizvoll machen. Obwohl das Kollagen zu den meistuntersuchten Proteinen überhaupt gehört, ist es aufgrund seiner besonderen Primärstruktur außerordentlich schwierig, Detailfragen seines Aufbaus zu klären. Unsere heutigen Kenntnisse von seiner Biosynthese, seiner Struktur und seiner Funktion sind deswegen noch lückenhaft. Dabei ist die Klärung dieser noch offenen Fragen durchaus notwendig, um die Vorgänge der Gerontogenese, die mit der Alterung des Kollagens eng verbunden ist, sowie die Entstehung von Kollagenkrankheiten (Silicose, Rheumathismus), den Prozess der Wundheilung und die industriell bedeutsame Ledergerbung zu verstehen.

1.1.1. Quartärstruktur.

Das Kollagen unterliegt im Körper einem außerordentlich langsamen Katabolismus, der in der spezifischen, streng

---

* In diesem Kapitel wird weitgehend auf das Zitieren der Originalliteratur verzichtet; dafür wird auf kürzlich erschienene Monographien und Übersichtsartikel zum Thema Kollagen verwiesen: Graßmann et al. (1965), Reich (1966), G.N. Ramachandran (1967) und Kühn (1967).

geordneten Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins begründet liegt. Aus diesem Grunde ist es zur Ausbildung sehr stabiler Stützstrukturen befähigt. Es bildet in dem extrazellulären Raum der Bindegewebe ein dreidimensionales Netzwerk scheinbar ungeordneter und endloser Fasern. Deren Strukturelemente, fibrilläre Filamente, bilden sich, indem sich Kollagenmoleküle zusammenlagern, und zwar aufgrund ihres Ladungsmusters etwa um ein Viertel ihrer Länge gegeneinander versetzt ("staggered array"). Sie werden dabei unlöslich. Dieser als Reifung bezeichnete Vorgang beruht auf der Ausbildung von Quervernetzungen zwischen den Peptideinzelsträngen, die das Molekül aufbauen ("intramolekulare Quervernetzungen"), sowie zwischen den Molekülen ("intermolekulare Quervernetzungen").

Das elektronenoptische Bild zeigt nach Anfärbung der sauren Gruppen mit Uranyl- oder Chromsalzen bzw. der basischen Reste mit Phosphorwolframsäure ein hochunterteiltes, asymmetrisches Querstreifenmuster. Es hat wegen der ziegelsteinartig versetzten Anordnung der Moleküle in der Fibrille eine Identitätsperiode von 640 Å, obwohl die Länge eines Moleküls 2 800 Å beträgt.

In vitro können neben Fibrillen des nativen Typs auch künstliche Quartärstrukturen erhalten werden, von denen die interessanteste die sogenannten Long Spacing Segmente sind. Sie entstehen durch parallele, gleichgerichtete, mit den Enden abschneidende Aneinanderlagerung der Monomeren und spiegeln direkt Länge und Ladungsmuster der Moleküle wider: Die dunklen Streifen entsprechen den vorwiegend polaren, die hellen den nicht anfärbbaren, kristallin geordneten apolaren Bereichen.

Die lösliche Vorstufe der gereiften Kollagenfibrillen kann aus dem Bindegewebe durch Neutralsalzlösungen extrahiert werden. Aus dem unlöslichen Rückstand läßt sich eine zweite Kollagenfraktion durch saure Extraktion gewinnen. Das säurelösliche Kollagen stellt keine Vorstufe der reifen Kollagen-

fibrillen dar; es ist jedoch wegen seines höheren Reinheitsgrades gegenüber der neutralsalzlöslichen Fraktion und aufgrund seiner Löslichkeit gegenüber den hochvernetzten Fibrillen bei gleicher Molekülgröße, Tertiärstruktur und Aminosäurezusammensetzung das bevorzugte Ausgangsmaterial für die Untersuchung der Tertiär- und Primärstruktur des Kollagens.

1.1.2. Sekundär- und Tertiärstruktur.

Die spezifische Faltung der Proteine ist von zentraler Bedeutung für die Erfüllung ihrer Funktion. Das Kollagenmolekül ist ein steifes Stäbchen. Es ist 2 800 Å lang, 14.5 Å dick und besitzt ein Molekulargewicht von fast 300 000. Die besondere Steifheit wird durch seinen Aufbau erreicht.

Die genaue Analyse der Röntgenstrahlinterferenzen führte im Zusammenhang mit Ergebnissen der Primärstrukturuntersuchung zu der Vorstellung, daß das Kollagenmolekül als Dreikettenschraube aufgebaut ist. Nach Strukturmodellen von Ramachandran und Kartha (1954,1955) bzw. Rich und Crick (1955) sind drei einzelne, linksgewundene Peptidstränge, die als α- Ketten bezeichnet werden (Sekundärstruktur), zu einer gemeinsamen, rechtsgewundenen Überschraube (Tertiärstruktur, "coiled coil") verdrillt. Diese Kollagenhelix wird durch quer zur Molekülachse angeordnete Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die Modelle unterscheiden sich nur in der Anzahl der H-Brücken und damit in der Deformierbarkeit der streng tripelhelicalen Struktur. Dieser charakteristische Aufbau des Kollagenmoleküls ist daran gebunden, daß in seiner Aminosäurefolge Glycin in jeder dritten, nämlich der dem Inneren der Schraube zugekehrten Position steht. Eine bedeutende Rolle bei der Stabilisierung der Tripelhelix spielen auch die besonderen stereochemischen Eigenschaften der Pyrolidinringe der häufigen Sequenz Gly-Pro-X (X = jede beliebige Aminosäure einschließlich Hydroxyprolin). Aufgrund der besonderen Bindungsverhältnisse der Iminosäuren schließen sie nämlich die Ausbildung einer α-

Helix mit Wasserstoffbrücken innerhalb eines Stranges parallel zur Faserachse aus.

Die Tertiärstruktur ist bis knapp oberhalb der Körpertemperatur der Individuen stabil. Das Kollagen der Invertebraten und Kaltblütler denaturiert bereits bei Temperaturen, die bei 30° C und z.T. sogar noch wesentlich tiefer liegen. Der Denaturierungspunkt für lösliche Säugerkollagene liegt bei 36 bis 38° C. Die Unterschiede in der Denaturierungstemperatur hat man mit dem wechselnden Gehalt an Iminosäuren in Verbindung gebracht.
Als Denaturierungstemperatur T_m ist diejenige Temperatur definiert, bei der sich im Gleichgewicht 50 % der Aminosäuren des Moleküls im helicalen und 50 % im statistisch geknäuelten Zustand befinden. Im ersten Schritt der Denaturierung bricht die Tertiärstruktur zusammen. Der Vorgang äußert sich in einer drastischen Änderung aller mit dem steifen Aufbau verbundenen Parameter. Er läßt sich besonders einfach durch den Abfall der spezifischen optischen Drehung verfolgen. Ihr hoher negativer Betrag geht für das native Molekül bei weitem über den der unverknüpften Aminosäurereste hinaus und ist ein Maß für die starre, durch die Primärstruktur erzwungene Anordnung zu einem asymmetrischen Molekül. In einem zweiten Schritt werden die Polypeptidketten räumlich voneinander getrennt.

Die Denaturierung kann auch bei tieferen Temperaturen erreicht werden, wenn der Kollagenlösung Agenzien zugesetzt werden, die die Stabilität des Moleküls herabsetzen. Bewährt haben sich als Denaturierungsmittel Harnstoff, Guanidinium- und Calciumsalze sowie die Salze des Rhodanids (Hippel und Wong, 1962, 1963 a und b).
Es sind jedoch auch Protonen in der Lage, die Tripelhelix des Kollagens zu destabilisieren. Maßgeblich beteiligt an diesem Effekt scheint die Änderung des Ladungszustandes der protonierbaren Gruppen im Molekül zu sein. In der Nähe des pK_a-Wertes der sauren Seitenketten fällt die Denaturierungstemperatur bei geringer pH-Erniedrigung sprunghaft ab, da

die nun überwiegenden positiven Ladungen nicht mehr durch Ionenpaarbildung im Molekül kompensiert werden und durch elektrostatische Abstoßung die Stabilität der Tertiärstruktur herabsetzen (Dick und Nordwig, 1966).
Über den Mechanismus der Salzdenaturierungen gibt es bisher nur Vermutungen. Man nimmt an, daß die Salze molekülstabilisierende H-Brücken sprengen.

Obwohl die Denaturierung mit einem großen Entropiegewinn verbunden ist, läßt sich die Tertiärstruktur des Kollagens wiederherstellen, da sie unterhalb der Denaturierungstemperatur als Struktur niedrigster Freier Energie begünstigt ist. Die ursprüngliche Tripelhelix wird aus den völlig getrennten Einzelsträngen jedoch nur sehr langsam zurückgebildet.

Arbeiten von Piez und Mitarbeitern (1960, 1961, 1963) haben gezeigt, daß denaturiertes Kollagen aus mehreren Komponenten besteht. Die Sedimentation in der Ultrazentrifuge läßt neben den Einzelsträngen (α) die Anwesenheit von Di- und Trimeren (β bzw. γ) erkennen, die durch Ausbildung von Quervernetzungen entstanden sind.
Die Gradientenelution an CM-Cellulose zeigt darüber hinaus, daß auch diese mono-, di- und trimeren Fraktionen inhomogen sind. Das Kollagenmolekül ist aus drei Peptidsträngen aufgebaut, von denen zwei mit α_1 bezeichnet werden. Die dritte Kette, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung von diesen deutlich abweicht, wird mit α_2 bezeichnet. Neueste Ergebnisse machen wahrscheinlich, daß auch die beiden α_1-Ketten sich in ihrer Aminosäuresequenz oder ihren an die Seitenketten gebundenen Gruppen geringfügig unterscheiden (vergl. Heidrich und Wynston, 1965; Francois und Glimcher, 1965, 1967 a und b; Kühn und Stark, 1968). Durch Quervernetzung entstehen die entsprechend mit β_{11}, β_{12}, γ_{111}, γ_{112}, und γ_{122} bezeichneten Di- und Trimeren. Stabilitätsuntersuchungen von Kühn et al. (1965) zeigen aufgrund des unterschiedlichen Renaturierungsverhaltens der chromato-

graphisch isolierten, homogenen Einzelketten, daß der α_2-Strang wesentlich instabiler ist als die α_1-Kette.

1.1.3. Primärstruktur des Kollagens.

Die übergeordneten Strukturen aller Proteine sind durch die Aminosäuresequenz determiniert und stellen die Anordnung niedrigster Freier Energie dar. Dementsprechend wird der charakteristische Aufbau des Kollagenmoleküls und die Zusammenlagerung der Moleküle zur Fibrille und Faser in erster Linie durch die Eigenarten seiner Primärstruktur gesteuert.

An der Aminosäurezusammensetzung des Kollagens ist von besonderem Interesse, daß Glycin zu etwa einem Drittel am Gesamtgehalt beteiligt ist. Das Kollagen ist weiterhin durch einen hohen Gehalt an Iminosäuren (Prolin und das in der Natur selten vorkommende Hydroxyprolin) gekennzeichnet. Auffällig ist der Mangel an aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren.
Graßmann und Mitarbeiter (vergl. die Übersichten von Graßmann et al., 1965, sowie Hannig und Nordwig, 1967) konnten zeigen, daß Glycin über größere Bereiche hinweg in jeder dritten Position steht und die apolaren Bereiche überwiegend aus Sequenzen des Typs $(\text{Gly-Pro-X})_n$ aufgebaut sind.

Aufgrund dieser besonderen Aminosäurefolge und der aus ihr resultierenden tripelhelicalen Struktur wird natives Kollagen von fast allen Proteasen nur sehr langsam, und zwar von den Enden her verdaut (Stark und Kühn, 1967). Die erwähnte Sequenz ist jedoch selbst im denaturierten Zustand enzymatisch nicht angreifbar.
Eine Ausnahme von dieser Regel stellt die Kollagenase aus Clostridien dar, welche die Tripeptid - Polymeren der apolaren Bereiche auch des nativen Kollagens in die monomeren Gly-Pro-X - Einheiten spaltet und dadurch wertvolle Aussagen über deren Aufbau ermöglicht hat (Mandl, 1961; Nordwig,

1962). Ihre Anwendbarkeit auf sequenzanalytische Probleme ist damit aber praktisch erschöpft.

Über die Sequenzen der polaren Bereiche hat man noch keine detailierten Kenntnisse. Man weiß lediglich, daß in ihnen saure oder basische Aminosäuren gehäuft auftreten.
Diese Einzigartigkeit der Primärstruktur, d.h. die schon oben erwähnte Periodizität, gemeinsam mit der Molekülgröße und dem Aufbau des Moleküls aus prinzipiell ähnlichen Untereinheiten erklären die besondere Hartnäckigkeit, mit der sich das Kollagenmolekül allen Versuchen einer durchgehenden Sequenzaufklärung widersetzt hat. Bisher sind die Aussagen über die Primärstruktur des Kollagens summarisch geblieben. Der Grund liegt unter anderem darin, daß es bis zu Beginn dieser Arbeit keine erfolgreichen Versuche gab, das Kollagen in geeignet große Bruchstücke zu spalten, um seine durchgehende Sequenzanalyse in Angriff nehmen zu können.

1.2. Nichtenzymatische Spaltungsreaktionen.*

Um ein großes Proteinmolekül in seiner Primärstruktur aufzuklären, sind sehr spezifische Spaltungsmethoden notwendig, die zu nur wenigen, leicht trennbaren Bruchstücken führen. Enzymatische Verfahren sind dabei nicht immer anwendbar: Die Spezifität der meisten Proteasen ist nicht genügend ausgeprägt. Selbst im Falle spezifischer Enzyme kommen im großen Molekül des Kollagens hydrolisierbare Bindungen auch dann noch häufig vor, wenn man durch Veränderung der Seitenketten die Spezifität des Enzyms einschränkt oder umdirigiert (z.B. King, 1966; Toi et al., 1967; Braunitzer et al., 1968, bzw. Walsh et al., 1964). Darüber hinaus erschwert die gewisse Periodizität der Primärstruktur des Kollagens die Trennung der Spaltpro-

---

* Übersichtsreferate hierzu sind bei Witkop (1961), Witkop und L.K. Ramachandran (1963), Hirs (1964) und Bodo (1966) zu finden.

dukte noch zusätzlich.

Auch von Trypsin, der Protease größter bekannter Spezifität wird denaturiertes Kollagen zu einer nicht übersehbaren Vielzahl schwer trennbarer Peptide gespalten. Dieser Befund darf als stellvertretend für alle Proteine größeren Molekulargewichts gelten und zeigt die prinzipiellen Schwierigkeiten rein enzymatischer Methoden auf.

Deswegen richtete sich das Augenmerk der Biochemiker auf die nichtenzymatische Spaltung von Peptidbindungen, an denen seltenere Aminosäuren beteiligt sind. Es sind heute bereits ziemlich viele Methoden bekannt, befriedigende Ergebnisse gibt es jedoch im allgemeinen nur für kleinere Proteine. Eine ideale Spaltungsmethode, die sich für die Strukturaufklärung aller Proteine anwenden ließe, ist jedoch noch nicht gefunden worden. Zu zahlreich sind die Möglichkeiten zu Nebenreaktionen, wie unspezifische Veränderung nichtbeteiligter Seitenketten durch das Reagenz selbst oder auch hydrolytische Spaltung durch die zumeist erforderlichen, unphysiologischen Reaktionsbedingungen.

Man kann alle nichtenzymatischen Spaltungsreaktionen in zwei Gruppen einteilen (s. Abb. 1):

Zur ersten Gruppe gehören solche Reaktionen, durch die der Carbonyl-Kohlenstoff nucleophil substituiert wird. Nach diesem nucleophilen Mechanismus verlaufen alle hydrolytischen Spaltungen (Allison und Grice, 1962; Lenard und Hess, 1964), weiterhin die Lösung der Cysteinpeptidbindung nach spezifischer Veränderung der Seitenkette (Sokolovsky und Patchornik, 1964), sowie die Hydrolyse der Bindungen des Prolins und Hydroxyprolins nach Birch-Reduktion der tertiären Amidgruppierung (Patchornik et al., 1964; Ruttenberg et al., 1964; Benisek et al., 1965, 1967).

Bei der zweiten Gruppe von Spaltungen reagiert ein freies Elektronenpaar der aufgerichteten Carbonylfunktion in einem

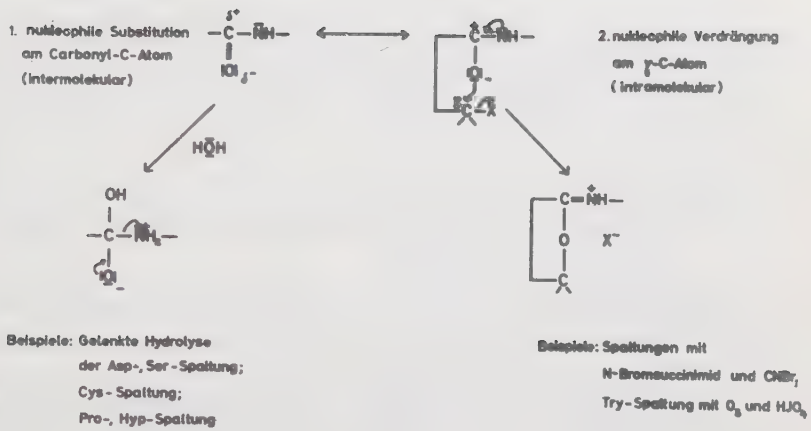


Abb. 1: Reaktionsschema nichtenzymatischer Spaltungsreaktionen.

nucleophilen, intramolekularen Verdrängungsschritt mit dem γ- C - Atom nach spezifischer Veränderung der Seitenkette. Hierbei entsteht durch Ringschluß und Ladungsverschiebung ein Iminolacton, dessen Iminoäthergruppierung hydrolysabel ist.

Diesem Mechanismus folgen die Spaltung von Tryptophylbindungen nach Oxydation mit Ozon (Scoffone et al., 1963; Previero et al., 1966, 1967 a,b,c) bzw. mit Perjodat (Atassi, 1967), wie auch die oxydative Spaltung der Peptidbindungen von Tryptophan, Tyrosin, Histidin und Phenylalanin mit N-Bromsuccinimid (NBS), die im Arbeitskreis von Witkop ausgearbeitet wurde (Übersichtsreferate hierzu s. Izumiya et al., 1962; Patchornik und Shaltiel, 1963). Grundsätzlich reagieren alle genannten Aminosäuren mit NBS, wenn auch mit deutlich abgestufter Geschwindigkeit. Durch einige Kunstgriffe läßt sich die Reaktion weitgehend selek-

tiv gestalten (Funatsu et al., 1964; Wilcnek und Witkop, 1967). Es finden jedoch stets Nebenreaktionen statt, und die erzielten Spaltungsausbeuten sind niedrig.

Das wichtigste Beispiel der intramolekularen nucleophilen Reaktionsgruppe ist jedoch die Spaltung von Methionylpeptidbindungen mit Bromcyan. Auf diese Spaltungsmethode soll ausführlicher eingegangen werden.

1.2.1. Die Methioninspaltung mit Bromcyan*; Anwendung der Methode auf Kollagen.

Die Reaktion wurde von Gross und Witkop (1961, 1962, 1967) ausgearbeitet und zur Spaltung von Ribonuclease in die Proteinchemie eingeführt. Von den Autoren wird auch ein Reaktionsmechanismus der Umsetzung von Modellpeptiden angegeben (vergl. Abb 23); doch liegen - wie später diskutiert wird - bei Protein besondere Verhältnisse in Bezug auf den Mechanismus vor, die insbesondere den Einfluß von Wasserstoffionen und Salzen auf den Ablauf der Spaltungsreaktion betreffen. Diese Fragen sind noch nicht näher untersucht. Man weiß lediglich, daß zur Spaltung von Proteinen ein niedriges pH erforderlich ist. Die Reaktion wurde zumeist bei Raumtemperatur, allerdings nie in Gegenwart denaturierender Agenzien durchgeführt.

Wegen des geringen Methioningehaltes der meisten Proteine und der recht guten Spezifität der Bromcyanreaktion ist sie schon häufig angewendet worden.
Aus einer großen Anzahl von Anwendungsbeispielen seien nur einige neuere Arbeiten angeführt, bei denen die Bromcyanspaltung entscheidend zur Sequenzaufklärung von Proteinen

---

* Übersichten s. bei Schreiber und Witkop (1964) und E. Gross (1967).

beigetragen hat: Edmundson et al. gelang die Spaltung und Sequenzierung von Myoglobin (1963, 1965), Yanofsky und Mitarbeitern die des A-Proteins der Tryptophansynthetase (Yanofsky et al., 1967; Drapeau et al., 1967). Subtilisin BPN' wurde von Smith et al. (1966) und Markland et al. (1967), eine bakterielle, extrazelluläre Nuclease von Anfinsen et al. (1963) und Taniuchi et al. (1966, 1967) vollständig in ihrer Primärstruktur aufgeklärt. Kürzlich wurde auch über erfolgreiche Sequenzarbeiten an ß-Lactoglobulin (Frank und Braunitzer, 1967) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (Davidson et al.1967) berichtet.

Bromcyan reagiert mit tertiären Aminen und Thioäthern in elektrophiler Reaktion, wobei intermediär ein "onium-Salz" gebildet wird (Hine, 1962), welches dann sehr leicht in intramolekularer S_N2-Reaktion weiterreagiert (vergl. Abb. 1). Der Mechanismus der Spaltung der Methionylbindung wird in Abb. 23 dargestellt und in Kap. 3.2. eingehend diskutiert.
Die Spaltungsreaktion verläuft für Modellpeptide selbst bei neutralem pH quantitativ. "Kleine Proteine" bis zu einem Molgewicht von etwa 25 000 erfordern jedoch zu ihrer Spaltung ein niedriges pH, lassen sich aber dann bei Raumtemperatur und zumeist recht kurzzeitiger Reaktion zufriedenstellend spalten. Die Autoren berichten über keine Nebenreaktionen oder unspezifische Hydrolyse. Es scheinen dabei jedoch nicht alle Methionylbindungen gleich schnell gespalten zu werden; z.B. fanden Black und Leaf (1965) bei Pferdeherz - Myoglobin, daß Met-Ser - Bindungen langsamer gespalten werden als Met-Lys.

Für Proteine mit einem Molgewicht über 25 000 scheinen außer einem niedrigen pH häufig auch eine erhöhte Reaktionstemperatur notwendig zu sein, um eine quantitative Spaltung zu erreichen. Diese verschärften Reaktionsbedingungen scheinen aber eine unspezifische Hydrolyse von Peptidbindungen zu begünstigen, die die anschließende Trennung der Spaltstücke

erschwert, wie Hofmann (1964) für das Trypsinogen (Molgewicht 23 000) und Steers et al. (1965) im Falle der ß-Galactosidase (Molgewicht 135 000 je Untereinheit) berichten. Man weiß jedoch sehr wenig über das Ausmaß der bei der Bromcyanreaktion auftretenden unspezifischen Hydrolyse.

Auf das Kollagen wurde die Bromcyanspaltung von zwei Arbeitskreisen gleichzeitig angewendet. Nordwig und Dick (1965) konnten zeigen, daß die Reaktion nur nach Denaturierung dieses Proteins und bei niedrigem pH sowie erhöhter Temperatur abläuft. Bornstein und Piez (1965) spalteten isolierte α-Ketten und fraktionierten das Abbaugemisch an CM-Cellulose. Letztere Autoren erwähnen dabei auch eine unspezifische Hydrolyse, die jedoch nicht quantitativ untersucht wurde.

In neueren Arbeiten gelang die begrenzte Spaltung des nativen Moleküls nahe dem nicht helical geordneten Aminoende (Bornstein et al., 1966 a,b,c; Kang et al., 1967). Das Spaltstück aus einer ß-Einheit enthält die von Piez postulierte, einzige intramolekulare Quervernetzung; die Restbruchstücke ähneln in ihren Eigenschaften verkürzten α_1- bzw. α_2-Ketten. Die abgespaltenen Bruchstücke, ein Fünfzehnerpeptid aus der α_1-Kette und ein Vierzehnerpeptid aus α_2, wurden kürzlich isoliert und ihre Aminosäuresequenz aufgeklärt. Bornstein (1967) gelang es, durch CNBr-Abbau isolierter α_1-Ketten auch ein sich daran carboxylseitig anschließendes Peptid aus 36 Aminosäuren zu gewinnen und seine Sequenz unter der Annahme aufzuklären, daß Glycin tatsächlich in jeder dritten Position steht. Heute scheint also die Reihenfolge von 51 der etwa 1 100 Aminosäuren einer α_1-Kette des Kollagenmoleküls festzustehen. Nach Abschluß der experimentellen Arbeiten dieser Dissertation scheint Piez und Mitarbeitern (Butler et al., 1967) die Isolierung aller erwarteten acht Abbaupeptide der α_1-Untereinheit gelungen zu sein.

1.3. Aufgabenstellung.

Voraussetzung für das Verständnis von Konformation und Eigenschaften eines Proteinmoleküls ist die Kenntnis seiner Primärstruktur, für deren Sequenzanalyse wiederum - besonders für große Proteine - sehr spezifische Spaltungsmethoden, die zu wenigen gut trennbaren Bruchstücken führen, Voraussetzung sind. Diese Forderung wird von den herkömmlichen Proteasen, wie oben ausgeführt, in vielen Fällen nur ungenügend, beim Kollagen aufgrund seiner Molekülgröße und wegen der erwähnten Periodizität seiner Primärstruktur jedoch besonders schlecht erfüllt.

Die nucleophilen Hydrolysereaktionen sowie die oxydative Tryptophanspaltung kamen wegen zu häufigen Vorkommens oder Fehlens der entsprechenden spaltbaren Bindungen für das Kollagen nicht in Frage. Weiterhin war die Spaltung mit NBS wegen geringer Ausbeuten und zahlreicher Nebenreaktionen wenig erfolgversprechend, so daß die Spaltung der seltener vorkommenden Methionylbindung mit Bromcyan als die aussichtsreichste der in der Literatur beschriebenen Spaltungsreaktionen erschien.
Ziel dieser Arbeit sollte es deshalb sein, die Bromcyanreaktion auf das denaturierte Kollagenmolekül anzuwenden, Einblicke in die Wirkungsweise des Reagenz zu gewinnen und den Weg zur Isolierung von Peptiden für die Sequenzaufklärung zu ebnen. Die Untersuchungen von Nordwig und Dick (1965) sowie Bornstein und Piez (1965) deuten darauf hin, daß die Bromcyanmethode im Prinzip am Kollagen durchführbar ist und deshalb wichtige Beiträge zur Aufklärung seiner Primärstruktur ermöglichen sollte. Die zu Beginn dieser Dissertation von Bornstein und Piez (1965) erzielte Trennung der Bruchstücke der isolierten α-Ketten war offensichtlich ungenügend, um ihre Sequenzanalyse zu ermöglichen.

Die Anwendung der Methioninspaltung auf das Kollagen ließ die Isolierung und Sequenzaufklärung längerer Abschnitte der

α -Ketten des Kollagens möglich erscheinen, wenn es gelänge, die Reaktion quantitativ und hochspezifisch zu gestalten. Man konnte hoffen, daß dabei auch die Isolierung polarer Bereiche und die der Übergänge zu den apolaren Regionen möglich wäre, worüber noch außerordentlich wenig bekannt ist.

So gut wie nichts wußte man jedoch über den wirklichen Ablauf der Spaltungsreaktion am Kollagen. Man konnte vermuten, daß bei dem für die Spaltung des Kollagens erforderlichen scharfen Reaktionsbedingungen (pH 1, 30 - 32°C) eine unspezifische Spaltung leicht hydrolysabler Peptidbindungen stattfindet. Das von Bornstein und Piez (1965) erzielte Elutionsdiagramm der Bruchstücke bekräftigte diesen Verdacht. Allerdings bedurfte es noch einer eingehenderen Untersuchung dieser Frage.
Durch Verfolgung der Spaltungskinetik sollte ferner versucht werden, zu einer genauen Vorstellung über den Ablauf der Bromcyanreaktion zu kommen. Zugleich sollten sich dabei die Einflüsse der H-Ionenkonzentration sowie denaturierender Salze auf den Ablauf der Reaktion feststellen lassen, so daß diese Untersuchungen schließlich eine quantitative Aussage über die Bromcyanspaltung erlauben sollten.

2. Ergebnisse

2.1. Versuche zur Auftrennung von Kollagenabbaupeptiden.

2.1.1. Die Bromcyanspaltung

Kollagen weist einen Methioningehalt von 0.5 - 0.6 Mol% auf (Schleyer, 1960; Piez et al., 1960), d.h. bei einem Molgewicht von 300 000 liegen etwa 5 - 6 Methioninreste pro α -Kette, bzw. 15 - 18 pro Molekül vor. Sofern die Reaktion mit CNBr quantitativ abläuft, können also 18 - 21 verschiedene Bruchstücke erwartet werden, bei Anwesenheit zweier identischer Ketten sogar nur 12 - 14. Die Voraussetzungen, die Spaltung am Kollagen zu versuchen, schienen also denkbar günstig.

In die Spaltungsreaktion wurde citratlösliches Kollagen in 0.05%iger Essigsäure eingesetzt. Durch Verfolgung der Abnahme der optischen Drehung (405 mu) bei verschiedenen Temperaturen wurden geeignete Bedingungen für die vollständige und schonende Denaturierung des Materials in diesem Medium ausgearbeitet. Die Versuchsreihen zeigten, daß eine Inkubation der Kollagenlösungen von 15 Minuten bei 45°C optimale Ergebnisse brachte (Abb. 2).
Das unter diesen Bedingungen behandelte Material zeigte in der Discelektrophorese keine Banden, die auf einen Abbau des Moleküls hindeuteten.

Das denaturierte Kollagen wurde sodann mit CNBr umgesetzt (pH 2, 32°C, Spaltungsdauer 48 Std.) und gefriergetrocknet, wie in Versuch 1.1., Kap. 4.2.* näher beschrieben.

Im folgenden wurde versucht, das durch den Abbau mit CNBr gewonnene Peptidgemisch ("Bromcyanabbaugemisch") aufzutrennen.

---

* Die im folgenden besonders gekennzeichneten Versuche werden im Experimentellen Teil, Kap. 4., detailiert beschrieben.

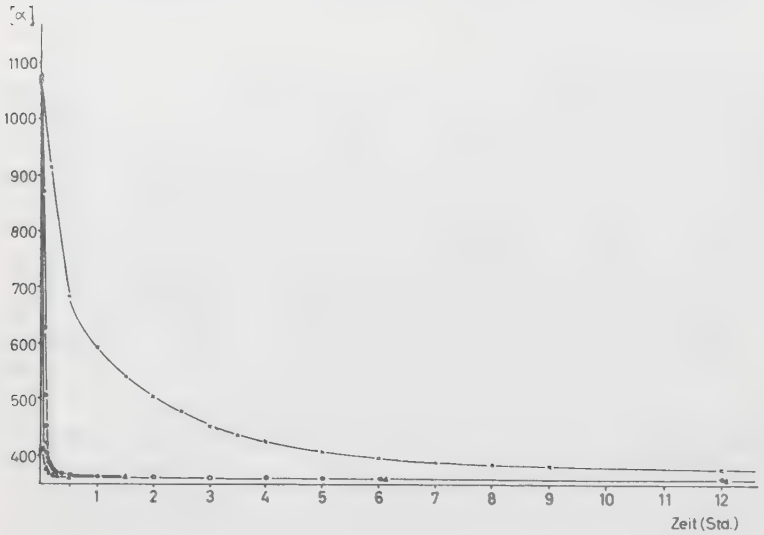


Abb. 2: Denaturierung von Kalbshautkollagen in 0.05%iger Essigsäure; x bei 40, o bei 42 und △ bei 45°C.

2.1.2. Versuche zur Vortrennung des Peptidgemisches.

Bornstein und Piez (1965) hatten nach Spaltung von isolierten α-Ketten mit CNBr eine nur wenig überzeugende Trennung der Bruchstücke an CM-Cellulose - Austauschersäulen erhalten. Bei einem Abbaugemisch des Gesamtkollagens sollten sich diese Schwierigkeiten naturgemäß noch steigern. Es wurde daher versucht, zunächst eine geeignete Vortrennungsmethode zu ermitteln; dabei sollten wechselweise Molekülgröße und Ladungsmuster als Trennparameter ausgenutzt werden.

2.1.2.1. Vortrennung auf der Grundlage der Unterschiede in der Molekülgröße.

Die Untersuchungen ergaben eindeutig, daß eine Trennung der Bruchstücke nach ihrer Größe als Vortrennungsmethode ungeeignet war. In den ersten Versuchsreihen wurde die Dialyse eingesetzt (Versuch 2); jedoch führten weder kurze noch lange Dialysezeiten, weder tiefe noch erhöhte Temperaturen zu einem befriedigenden Ergebnis. Sowohl Dialysat wie auch Retentat enthielten eine sehr große Anzahl von Peptiden, was chromatographisch (vergl. hierzu Kap. 4.1.) nachgewiesen werden konnte. Es bestand also keine Aussicht, ein Bruchstück in vernünftiger Ausbeute isolieren zu können. Auch Druckdialysen führten nicht weiter.

Mit der Fraktionierung an Sephadex steht seit einiger Zeit eine säulenchromatographische Methode zur Verfügung, die eine Auftrennung von Substanzgemischen nach der Molekülgröße ermöglicht (Porath und Flodin, 1959). Sie sollte also für das geschilderte Problem geeignet sein. Jedoch auch bei Verwendung von Sephadex verschiedenen Vernetzungsgrades (G 50, G 100, G 200) konnte weder mit kurzen noch mit langen Säulen, weder bei tiefer noch bei erhöhter Temperatur eine befriedigende Fraktionierung des Gemisches erreicht werden (vergl. Versuch 3.1.). Discelektrophoretische Untersuchungen und Dünnschichtchromatogramme zeigten, daß in den verschiedenen Fraktionen stets eine Vielzahl sehr ähnlicher Bruchstücke vorlagen. Auch die quantitative Zusammensetzung unterschied sich nur unerheblich. Die Schwierigkeit lag offensichtlich darin, daß die Abbaupeptide in ihrer Größe zu wenig differierten und die Trennvorgänge deswegen unvollständig abliefen.

2.1.2.2. Ausnutzung von Unterschieden im Ladungsmuster.

Mit der trägerfreien Elektrophorese (Hannig, 1964, 1967) steht eine vorzügliche Methode zur Trennung geladener

Makromoleküle zur Verfügung. Das Substanzgemisch wird in die Trennkammer der Elektrophoreseapparatur kontinuierlich eingespritzt und wandert im strömenden Pufferfilm senkrecht zum angelegten elektrischen Feld dem Kammerende zu, wo ein Entnahmesystem die Sammlung der fraktionierten Proteinkomponenten ermöglicht. Die Proteinteilchen wandern entlang der Resultierenden aus Feldstärke und Puffergeschwindigkeit. Sie werden umso weiter aus der Senkrechten zu den Elektroden hin abgelenkt, je stärker sie bei gegebenen pH geladen sind. Durch Variation von Feldstärke, Pufferstrom und pH können für das jeweilige Trennproblem optimale Bedingungen ausgearbeitet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Versuche unternommen, das Bromcyanabbaugemisch in der trägerfreien Elektrophorese aufzutrennen (sie wurden als Versuche 5.1. und 5.2. zusammengestellt). Durch Senkung der Pufferleitfähigkeit und Erhöhung der Spannung wurde die auf Proteinteilchen wirkende Feldstärke vergrößert, ohne daß es jedoch möglich war, gut getrennte Peaks zu erhalten. Das Elutionsdiagramm zeigt unerwartet viele Peaks und Schultern (s. Abb. 3, und Versuch 5).

Weil das Kollagen arm an aromatischen Aminosäuren ist, reicht die Extinktion bei 280 mu zu seiner Bestimmung nicht aus. Aus diesem Grunde wurde trotz einiger Störungsmöglichkeiten die Absorption der Peptidbindungen zur Erfassung des Kollagengehaltes verwendet und die Proteinverteilung bei 230 mu gemessen (Piez et al., 1966). Da bei der elektrophoretischen Trennung in der Nähe der Elektroden hohe, apparativ bedingte Extinktionen die direkte Messung verfälschten, wurde zur Kontrolle eine Stickstoffbestimmung durchgeführt. Verwendet wurde eine Ultramikromethode (Strauch, 1965). Durch Vergleich der Stickstoffwerte mit der Extinktion bei 230 mu wurde bei bekanntem N-Gehalt des Kollagens (Schleyer, 1960) ein Umrechnungsfaktor für die Bestimmung der Proteinausbeute errechnet: $\varepsilon_{230} \times 1.701 = \text{mg Kollagen}$. Dieser Faktor

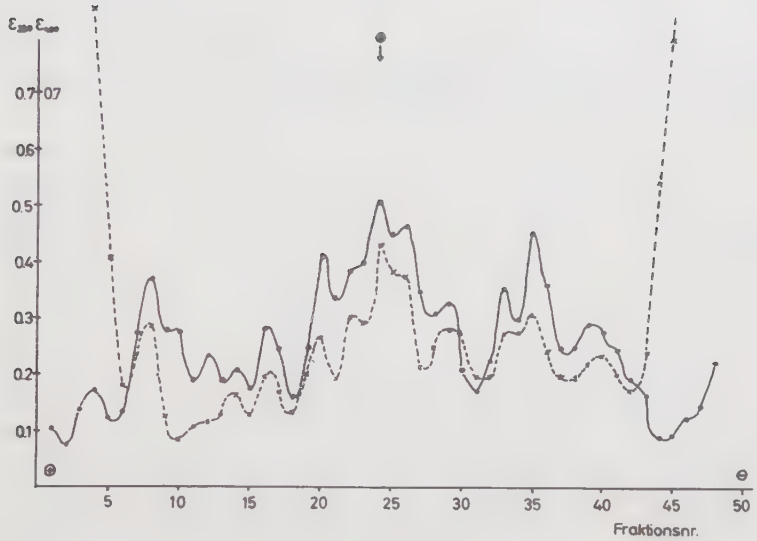


Abb. 3: Auftrennung des Bromcyanabbaugemisches in der senkrechten, trägerfreien Elektrophoreseapparatur VaP II (—— Messung bei 230 mu, --- Stickstoffbestimmung).

gilt exakt nur bei Verwendung von 0.05 %iger Essigsäure als Lösungsmittel, gibt aber dann recht befriedigende Ergebnisse.

Die schlechte Trennbarkeit der Abbaupeptide auch in der Elektrophorese machte es notwendig, weiter nach einem geeigneten Trennverfahren zu suchen. Bornstein und Piez (1965) hatten mit CM-Cellulose bei Abbaugemischen vorgetrennter α-Ketten keine überzeugenden Trennergebnisse erzielt, was ein Grund dafür war, in dieser Arbeit eine Auftrennung an CM-Sephadex zu versuchen. Die Überlagerung der Austauscherwirkung mit dem Molekularsiebeffekt ließ eine günstige Auswirkung auf die Trennung erhoffen. Mehrere Versuche, die der Pufferwahl und der Erprobung des Gradienten

dienten, zeigten, daß bei Verwendung von CM-Sephadex außerordentlich hohe Ionenstärken zur Elution der Kollagenbruchstücke erforderlich sind. Als geeignet erwies sich ein $CaCl_2$-Gradient (s. Abb. 4 und vergl. Versuch 4).

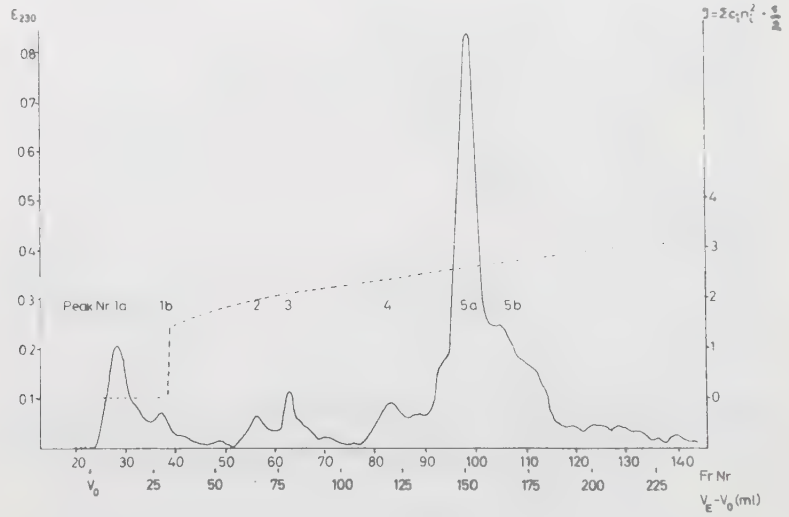


Abb. 4: Fraktionierung der Bromcyanabbaupeptide an CM-Sephadex.$CaCl_2$-Gradient; pH 4.5; I steigend von 0.01 bis 3.1. —— Extinktion bei 230 mu; ---- Ionenstärke.

Die Elution verläuft nicht quantitativ, so daß noch ein geringer Anteil des aufgegebenen Proteins auf der Säule verbleibt.

Der Hauptpeak (Peak 5a in Abb. 4) enthält vermutlich neutrale Peptide. Er ist sehr inhomogen (Dünnschichtchromatogramm) und wurde nicht näher untersucht, da es schwierig war, die großen Salzmengen abzutrennen.

Aus diesen Gründen wurde in den weiteren Versuchen nur der erste Peak (1a und 1b mit der hier kaum sichtbaren Schulter 1c; vergl. Abb. 4 und Abb. 5) eluiert. Wie Dünnschichtchromatogramme und discelektrophoretische Untersuchungen zeigten, war auch dieses Material sehr inhomogen. Es konnte jedoch ohne Anwendung hoher Ionenstärken eluiert werden; die Ausbeute betrug etwa 8 bis 12 % des aufgegebenen Proteins. Dieser Peak enthielt überwiegend die sauren, längerkettigen Peptide, die aufgrund ihrer negativen Ladung bei pH 4.5 sowie ihrer Größe nicht am Austauschermaterial zurückgehalten wurden. Sie schienen besonders interessant, da sie überwiegend aus den polaren Bereichen des Kollagenmoleküls stammen sollten, über deren Sequenz nichts bekannt ist.
Für präparative Zwecke wurden größere Säulen eingesetzt, wodurch die Trennung von Proteinmengen bis zu 500 mg in einem Lauf möglich war. Drei Fraktionen (1a,b,c, Abb. 5) wurden abgetrennt und weiter untersucht.

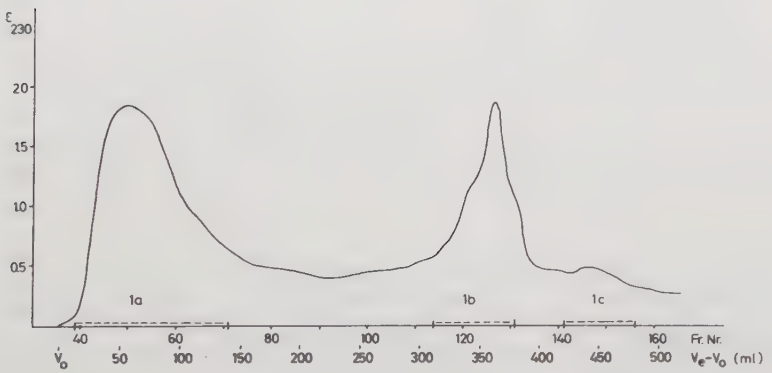
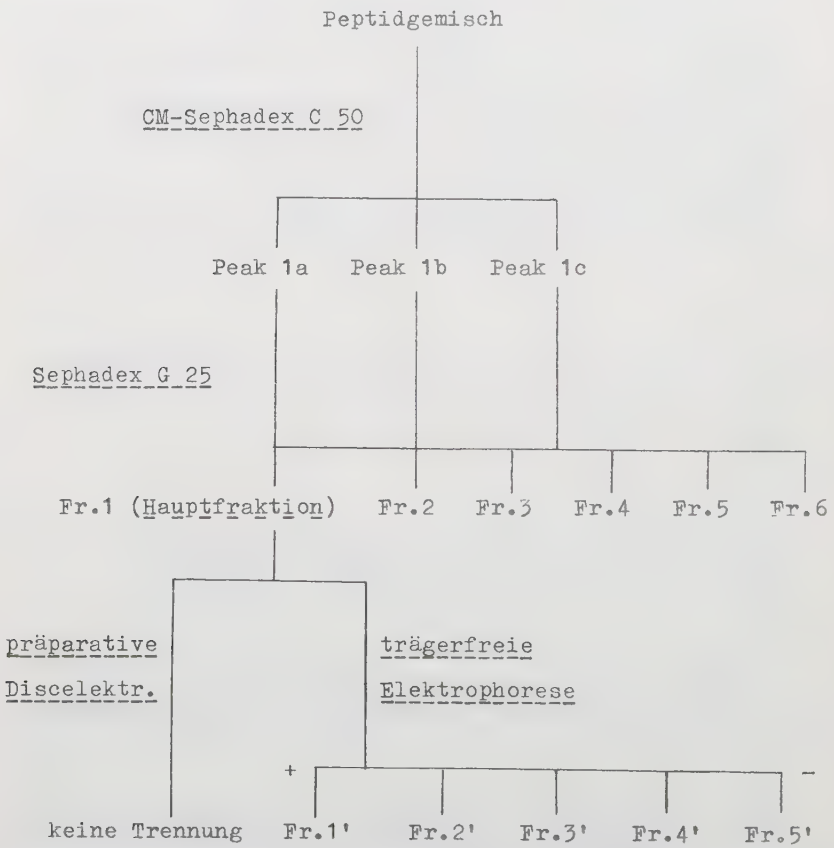


Abb. 5: Elution des in Abbildung 4 mit 1a und b bezeichneten Peaks an CM-Sephadex. Präparativer Ansatz (hierbei trat eine zusätzliche mit 1c bezeichnete Schulter auf). —— Messung bei 230 mu, --- abgetrennte Fraktionen.

2.1.3. Weitere Auftrennung der erhaltenen Peptidfraktionen.

Die in Abb. 5 mit 1a - c bezeichneten Peaks der Chromatographie an CM-Sephadex C 50 wurden an Sephadex G 25 weiter aufgetrennt (vergl. das Schema) und zugleich entsalzt (Versuch 3.2.).

Trennschema:



Auftrennung eines Peptidgemisches, das durch Umsetzung von denaturiertem Kollagen mit CNBr erhalten wurde. Erläuterung im Text.

Bei der Entsalzung jedes der drei vorstehend mit 1a - c bezeichneten Proteinpeaks wurden sechs Peaks erhalten. Unabhängig davon, welcher der Peaks chromatographiert wurde war die Fraktion 1 (Hauptfraktion) in allen drei Versuchen identisch, wie eine analytische Untersuchung durch Discelektrophorese und Dünnschichtchromatographie ergab; desgleichen waren auch die analogen Fraktionen 2 - 6 jeweils identisch und wurden vereinigt. Kein Peak war homogen; jeder enthielt Bruchstücke, die auch in den Nachbargipfeln auftraten. Durch Dünnschichtchromatographie aller Fraktionen ließen sich insgesamt 10 - 12, durch Dünnschichtelektrophorese der "DANSylierten" Peptide (Gray und Hartley, 1963) 12 und durch Discelektrophorese 13 Komponenten nachweisen. Die Hauptfraktion enthielt wenigstens 8 Komponenten (Discelektrophorese), was auch durch Endgruppenbestimmungen mit der DNP-Methode nach Sanger, 1945 (Variante nach Schroeder et al., 1963) bestätigt wurde. In Fraktion 1 ist der Gehalt an sauren Aminosäuren auf 14.6 Mol%, bei Peak 5 sogar auf 16.5 Mol% angewachsen gegenüber 12.1 Mol% beim Kollagen. Entsprechend ist der Basenanteil auf 6.1 bzw. 5.4 Mol% gefallen gegenüber 8.8 Mol% im Ausgangsmaterial. Das Ergebnis der Aminosäureanalyse bestätigt also die Folgerungen aus dem Elutionsverhalten der Peptide am Kationenaustauscher CM-Sephadex.
Aus quantitativen Gründen wurde ausschließlich der Hauptpeak weiter untersucht.

Die analytische Discelektrophorese stellt eine ausgezeichnete Trennmethode dar; deshalb konnte man sich eine weitere Auftrennung der Hauptfraktion 1 durch eine präparative Variante dieser Methode (Strauch, 1967) erhoffen. Die Erwartungen erfüllten sich jedoch nicht. Trotz Übernahme der für die analytische Apparatur erprobten Bedingungen wurde das Protein in einem einzigen Peak eluiert. Auch die Auftrennung des Gesamtabbaugemisches war wenig erfolgreich: Hierbei wurden drei, sich stark überlappende Peaks mit zahlreichen Schultern erhalten (Strauch, 1967).

Das Eluat enthielt neben den Kollagenfraktionen andere stickstoffhaltige, UV-absorbierende und mit Ninhydrin anfärbbare Substanzen; die Schwierigkeit der Messung des Kollagens wurde deshalb durch Anwendung der Hydroxyprolinbestimmung nach Stegemann (1958, 1967) in der Variation von Chvapil und Hurych (1962) umgangen. Sie wurde modifiziert, so daß dadurch die schnelle Bestimmung von Hydroxyprolin in Serieneluaten möglich war (vergl. Versuch 9).

Trotz verschiedener Versuche gelang es nicht, die Hauptfraktion 1 in der präparativen Discelektrophorese aufzutrennen. Deshalb wurde versucht, mit der trägerfreien Elektrophorese ans Ziel zu kommen: Es gelang die Auftrennung in fünf Peaks, von denen drei quantitativ sehr gering waren (s. Versuch 5.1.). Die bei pH 4.9 anodisch gelaufene Hauptfraktion 1' (vergl. das Trennschema) ließ in der Discelektrophorese noch immer 7 Banden erkennen. Die mengenmäßig zweitgrößte Fraktion 4', die nur geringfügig anodisch gewandert war, enthielt fünf Komponenten.

Spätestens zu diesem Zeitpunkt war klar geworden, daß bei der Umsetzung des Kollagens mit CNBr wesentlich mehr Fragmente entstanden sein mußten als aufgrund des Methioningehaltes errechnet worden war.

Beide Fraktionen (1' und 4') wurden entsalzt und erneut in die trägerfreie Elektrophorese eingesetzt. Der pH des Kammerpuffers wurde auf 1.8 gesenkt. Durch die Umladung der Proteine bei diesem pH wurde eine weitere Auftrennung erwartet (vergl. Versuch 5.2.). Die Peptide unterlagen dabei jedoch starkem hydrolytischem Abbau, wie die Abnahme des mittleren Molekulargewichts und die Tatsache zeigte, daß sich die hierbei erhaltenen Bruchstücke in der Discelektrophorese nicht mehr anfärben ließen.
Auch dieser Weg für die Isolierung einheitlicher Spaltprodukte aus dem CNBr-Abbau des Kollagens hatte sich also

als wenig aussichtsreich erwiesen. Deshalb bedurfte zunächst die Frage nach der Zahl der entstandenen Bruchstücke einer eindeutigen Aufklärung.

2.1.4. Untersuchungen über die Zahl der bei der Bromcyanspaltung entstehenden Bruchstücke.

Durch eine unspezifische Hydrolyse der Peptidbindungen können mehr Bruchstücke als berechnet entstehen, und zwar bedingt durch die bei der Bromcyanreaktion verwendete hohe H-Ionenkonzentration. Dadurch liessen sich die Schwierigkeiten bei der Auftrennung der Spaltpeptide wohl am besten erklären. In der Literatur sind allerdings keine eindeutigen Hinweise darauf zu finden, daß die hohe, bei der CNBr-Reaktion erforderliche H-Ionenkonzentration eine Hydrolyse verursachen könnte.

Zunächst mußte das Ausmaß der unspezifischen Hydrolyse ermittelt werden.
Discelektrophoretische Untersuchungen des Abbaugemisches lieferten etwa 24 Banden sehr unterschiedlicher Intensität, von denen einige allerdings noch uneinheitlich sein konnten (s. Abb. 14, Gel Nr. 4). Das waren beträchtlich mehr als man zunächst erwartete.

Im folgenden soll deshalb die theoretische Anzahl der Bruchstücke bei Spaltung des Kollagens mit CNBr etwas genauer abgeschätzt werden. Für diese Überlegung wird angenommen, daß nur die Bindungen des Methionins gelöst werden.

Die α_1-Untereinheiten enthalten sieben, die α_2-Ketten fünf Methionylreste (Francois und Glimcher, 1967 b). Setzt man also isolierte α-Ketten in die CNBr-Spaltung ein, so kann man bei quantitativer Reaktion entsprechend acht bzw. sechs Bruchstücke erwarten. Berücksichtigt man die in nativen Kollagenpräparationen zusätzlich vorhandenen häufigsten Quervernetzungstypen, und zwar die intramolekulare Querver-

netzung am Aminoende des Moleküls (Bornstein et al., 1966 a und b; Piez et al., 1966) bzw. die intermolekulare "B an B" - Verknüpfung am Carboxylende (Kühn et al., in Vorbereitung), so kann man etwa 25 verschiedene Fragmente erwarten. Bei nichtquantitativer Spaltung erhöht sich diese Zahl auf mehr als 50 Spaltprodukte, wenn man annimmt, daß maximal ein Methioninrest pro α-Kette nicht mit CNBr reagiert (d.h. bei Spaltungsausbeuten, die über etwa 85 % liegen). Wenn man darüberhinaus berücksichtigt, daß auch die α_1-Ketten nicht völlig identisch sind (Heidrich und Wynston, 1965; Francois und Glimcher, 1965, 1967 a und b; Kühn und Stark, 1968), so wird deutlich, daß bei Spaltung des Kollagens mit CNBr bereits ohne die Annahme einer unspezifischen Hydrolyse eine sehr beträchtliche Anzahl verschiedener Bruchstücke entstehen kann.

Auf der anderen Seite muß man bedenken, daß die Ausbeute pro Bruchstück bei steigender Anzahl der Fragmente entsprechend sinkt: Bei quantitativer Spaltung isolierter α_1-Ketten beträgt die Ausbeute 12,5 Mol% eines jeden Bruchstücks pro Mol α_1. Setzt man jedoch nicht vorgetrenntes Kollagen mit CNBr um, so beträgt die maximal erreichbare Ausbeute für ein Bruchstück (nämlich für die sechs mittleren Fragmente der α_1-Untereinheiten) nur etwa acht Mol% pro Mol Kollagen; für die am seltensten auftretenden Bruchstücke, nämlich die quervernetzten methioninhaltigen Fragmente bei nichtquantitativer Spaltung, liegt die Ausbeute bei 0.01 Mol% pro Mol Kollagen.

Das Mengenverhältnis der Kollagenuntereinheiten, das dieser Ausbeuteberechnung zugrunde liegt, wurde aus Abb. 6 durch Planimetrieren der Peaks eines Disc-Elektropherogramms von Kalbshautkollagen ermittelt (s. auch Abb. 14, Gel Nr.1 und Versuch 6; Abänderungen: 0.35 m ß-Alaninpuffer, pH 4.8, Laufzeit 15 Stunden). Es ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Verhältnisse der Kollagenuntereinheiten.

	α_1	α_2	β_{11}	β_{12}	β_{22}	$\gamma_{111;112}$	$\gamma_{122;222}$
Anteil am Ges. Kollagen (Gew. %)	24	12	7	35	1	16	4

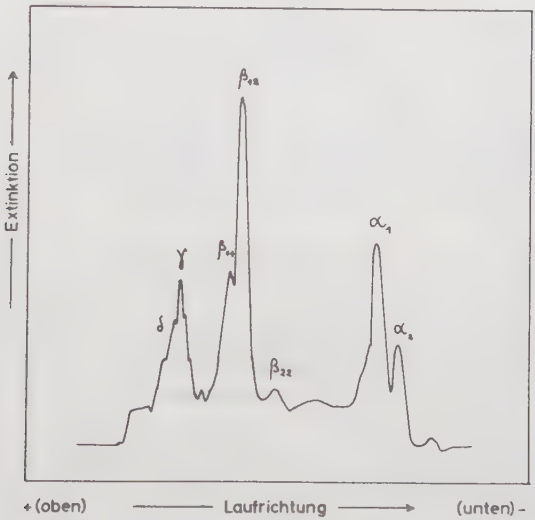


Abb. 6: Disc-Elektropherogramm von denaturiertem Kalbshautkollagen (vergl. Versuch 6 und Abb. 14, Gel Nr.1; die Kurve wurde durch Photometrieren eines angefärbten Gels erhalten).

Die vorstehend beschriebenen Überlegungen könnten also recht befriedigend die große und mit sehr unterschiedlicher Intensität auftretende Zahl von Banden in der Discelektrophorese erklären.

Sollte jedoch außerdem eine unspezifische Hydrolyse bei der Spaltung beteiligt sein, reicht die Discelektrophorese zu einem Nachweis dabei zusätzlich entstehender Bruchstücke freilich nicht aus. Aus diesem Grunde wurde außerdem der molare Zuwachs an Endgruppen im Verlaufe der Reaktion bestimmt. Bei nur spezifischer Spaltung kann dieser Wert trotz großer Bruchstückzahl den aus dem Methioningehalt von etwa 0.56 Mol% berechneten von etwa 17 Molen Endgruppen pro Mol Kollagen nicht übersteigen.

In dem Versuch wurde die spezifische Extinktion für das Abbaugemisch durch Anfärbung mit Ninhydrin (Moore und Stein, 1948; vergl. Versuch 8) bestimmt und die für ungespaltenes Kollagen subtrahiert. Die Differenz wurde in Leucinäquivalente pro Mol Kollagen umgerechnet und gibt die neu entstehenden Endgruppen pro Mol Kollagen an (vergl. Tabelle 2).

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß bei der Umsetzung des Kollagens mit CNBr etwa 61 Mole neue Endgruppen pro Mol Kollagen entstehen. (Bestimmung nach der Ninhydrinmethode); das hieraus berechnete mittlere Molekulargewicht der Bruchstücke beträgt 4 900. Eine Bestimmung nach der DNP-Methode (Graßmann et al., 1962) lieferte den Wert von 5 200 (vergl. Versuch 10.2.). Die aus dem Methioningehalt von 0.56 Mol% theoretisch ermittelten Werte betragen 16.8 Mole Endgruppen pro Mol Kollagen bzw. 15 500 für das Molgewicht. Es sind also wesentlich mehr Endgruppen entstanden als von der spezifischen Spaltung der Methionylbindungen herrühren können.

Zur weiteren Stützung des Verdachtes auf unspezifische Spaltung wurden die N- und C-terminalen Aminosäuren des Peptidgemisches bestimmt.
Unter den nach der DNP-Methode ermittelten Aminosäuren (Versuch 10.1.) überwiegen neben Gly vor allem Ser, Asp und Glu. Dieser Befund ist freilich wenig beweiskräftig, da man die carboxylseitigen Bindungspartner des Methionins im Proteinverband nicht kennt. Immerhin stützt das Auftreten von Amino-

Tabelle 2: Rechengang der molaren Endgruppenbestimmung für gespaltenes Kollagen. Von jeder Probe wurden zwei Einwaagen, von jeder Einwaage zwei Aliquote parallel bestimmt.

	Bromcyan-Abbaugemisch				ungespaltenes Kollagen					
	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4		Probe 5	
Einwaage (ug)*	188.2	186.7	244.2	242.8	217.9	219.7	220.8	221.5	196.7	200.2
Extinktion 575 mu **	0.358	0.359	0.472	0.472	0.320	0.320	0.321	0.319	0.283	0.300
ε_{575} pro 300 ug	0.570	0.572	0.579	0.583	0.437	0.440	0.436	0.435	0.431	0.424
Protein	0.575	0.577	0.583	0.579	0.440	0.437	0.433	0.432	(0.458	0.450)
Mittelwerte aus ε_{575} pro 300 ug		0.576				0.435				
dto. berechnet***		-				0.458				

Extinktionsdiff. der Meßw. f. gesp. und ungesp. Koll.	0.141
Mole Endgruppen pro Mol Kollagen ****	61.2
Mittleres Molgewicht	4900

* Proteinkonzentration pro 0.4 ml Probenvolumen, ermittelt durch Stickstoffbestimmung (Strauch, 1965); Umrechnungsfaktor: ug N . 5.84 = ug Kollagen (für den N-Gehalt des Kollagens s. Schleyer, 1960).

** pro 0.4 ml Lösung.

*** Grundlage für die Berechnung: Farbausbeuten nach Moore und Stein (1954) für Leu = 1.00, ε-Lys = 1.10, ε-Hyl = 1.12; Umrechnungsfaktor (Eichkurve): ε_{575} . 0.4345 = uMol Leu; Gehalt an Lys = 2.8 Mol%, an Hyl = 0.7 Mol%.

**** Molekulargewicht für Kollagen = 300 000.

säuren, deren Bindungen als säurelabil bekannt sind (vergl. Sanger, 1952; Allison und Grice, 1962 und Hill, 1965) den Verdacht auf unspezifische Säurehydrolyse.

Kollagen besitzt einige freie C-terminale Aminosäuren, die als Telopeptide aus der Tripelhelix herausragen, nämlich drei Mole Glycin und je ein Mol Alanin, Lysin und Arginin (Deyl et al., 1967 a). Bei der C-terminalen Aminosäurebestimmung des Peptidgemisches nach Akabori et al. (1952) sollten zusätzlich etwa 17 Mole Homoserin gefunden werden, falls nur Methionylbindungen gespalten werden. Die Hydrazinolyse wurde nach einer Modifikation von Braunitzer (1954, 1955) durchgeführt (vergl. Versuch 11). Es wurden hierbei jedoch nur etwa 30 % Homoserin neben gleichfalls 30 % Glycin sowie Alanin, Lysin, Arginin, Serin, Threonin, Hydroxylysin und Tyrosin gefunden.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen deutlich, daß eine unspezifische Spaltung beteiligt sein muß. (Sie wird im folgenden zur Differenzierung von der spezifischen CNBr-Reaktion etwas ungenau als "hydrolytische" oder "unspezifische" Spaltung bezeichnet). Zugleich kann man nun aufgrund der Ergebnisse der Endgruppenbestimmungen eine Desamidierung von Säureamiden als alleinige Ursache für das Ansteigen des Ninhydrintiters ausschließen.

2.2. Kinetische Verfolgung der Spaltungsreaktion mit Bromcyan.

Es war notwendig, die Spaltungsbedingungen zu modifizieren, damit bei Anwendung der CNBr-Reaktion auf das Kollagen die Hydrolyse auf ein Minimum zurückgedrängt wurde. Diesem Ziel sollte die kinetische Verfolgung der Spaltung dienen, d.h. vor allem die getrennte Untersuchung von spezifischer und hydrolytischer Spaltung unter Variation von Temperatur und pH als den Parametern, welche die Hydrolysegeschwindigkeit maßgeblich beeinflussen. Hierdurch sollte es möglich sein,

optimale Bedingungen für die spezifische Spaltung an der Methioninbindung zu gewinnen.
Methodisch wurde so vorgegangen, daß jedem Spaltungsversuch ein identisch behandelter Ansatz, nur ohne Bromcyan, zur Kontrolle der hydrolytischen Spaltung beigeordnet wurde. Zu bestimmten Zeiten wurden allen Ansätzen Proben entnommen, sofort tiefgefroren und gefriergetrocknet. Als analytische Methode wurde die Ninhydrinanfärbung eingesetzt und die Endgruppenzunahme sowohl allein unter den sauren Spaltungsbedingungen als auch bei Behandlung des Kollagens mit Bromcyan bestimmt. Der Extinktionswert für unbehandeltes, denaturiertes Kollagen wurde ermittelt und jeweils subtrahiert. Als Kontrolle für diese Ergebnisse diente eine weitere analytische Untersuchung, nämlich die Verfolgung der Methioninabnahme in Abhängigkeit von der Zeit durch Aminosäureanalysen der Proben (vergl. hierzu Kap. 2.4.3. und Versuch 7).

2.2.1. Spaltungsversuche bei erhöhter Temperatur nach Hitzedenaturierung des Kollagens.

In einer ersten Versuchsreihe sollte bei verschiedenen pH-Werten festgestellt werden, in welcher Zeit die Reaktion quantitativ abläuft. Gleichzeitig sollte der Anteil der Hydrolyse an der Gesamtspaltung ermittelt werden. Das Kollagen (Ansätze I-III) wurde, wie in Versuch 1 beschrieben, gereinigt und denaturiert. Anschließend wurde ein mit I bezeichneter Ansatz bei pH 1 und 30°C (vergl. Bornstein und Piez, 1965), zwei weitere bei pH 2 und 32°C (II, Nordwig und Dick, 1965) bzw. pH 2.5 und 32°C (III) mit Bromcyan umgesetzt. Sie werden im folgenden als I A, II A und III A bezeichnet. Die entsprechenden B-Proben dienten als bromcyanfreie Kontrollen (vergl. Nordwig und Bandlow, 1968). Zu den in den Diagrammen angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und für die analytischen Untersuchungen gefriergetrocknet. Dieser Versuch ist im Experimentellen Teil als Versuch 1.2. aufgeführt.

Die Umsetzung des Methionins im Kollagen der Reaktionsansätze I A, II A und III A mit Bromcyan wurde durch Aminosäureanalyse (vergl. Kap. 2.4.3.) der entnommenen Aliquote verfolgt. Die gefundenen Werte für das Restmethionin sind in Abb. 7a gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

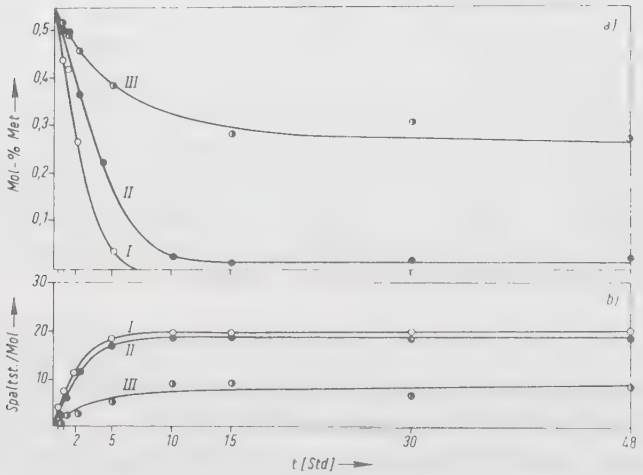


Abb. 7: CNBr-Spaltung von wärmedenaturiertem Kollagen:
a: Abnahme des Methionins mit der Reaktionszeit
b: Zunahme der spezifischen Spaltstellen pro Mol Kollagen mit der Reaktionszeit (berechnet aus dem Methioningehalt). Ansatz I: pH 1; 30°C. Ansatz II: pH 2; 32°C. Ansatz III: pH 2.5; 32°C (entnommen aus Nordwig und Bandlow, 1968).

Bei pH 1 und pH 2 verläuft die Spaltung innerhalb weniger Stunden quantitativ oder doch fast quantitativ. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei pH 1 trotz der um 2°C tieferen Reaktionstemperatur rascher als bei pH 2. Dagegen beträgt die Spaltung bei pH 2.5 und 32°C, also Bedingungen, die von denen des Ansatzes II A nur wenig verschieden sind, auch

bei längerer Reaktionsdauer nur etwa 50%.
Abb. 7b zeigt die Umrechnung der Methioninabnahme in eine Zunahme der Spaltstellen pro Mol Kollagen; es wurden die in Abb. 7a dargestellten Werte für den Methioningehalt und ein Molekulargewicht von 300 000 für das unbehandelte Material zugrundegelegt.

Die Verfolgung der Zunahme des Homoserins, das bei der Spaltungsreaktion aus dem Methionin als carboxylendständige Aminosäure entsteht, läßt sich nicht zur Kontrolle der gefundenen Methioninwerte einsetzen. Das Homoserin liegt nach der Hydrolyse im Gleichgewicht mit seinem Lacton vor. Es gelingt nicht, dieses durch Behandlung mit flüchtigen Basen quantitativ in die freie Aminosäure zu überführen. Andererseits erscheint das Lacton in der Aminosäureanalyse gleichzeitig mit dem Arginin. Es läßt sich auf einfache Weise nicht bestimmen, so daß die Werte für freies Homoserin sehr schwanken.

Die Aminosäureanalysen zeigen noch ein anderes interessantes Ergebnis: Die Hydroxysäuren werden z.T. während der Reaktion zerstört. Tyrosin nimmt unter den Spaltungsbedingungen nach 48 Stunden bei pH 1 um etwa 35 % seines Wertes ab. Bei Serin beträgt der Zerstörungsgrad etwa 12 %, bei Threonin etwa 3 - 4 %. Insgesamt beträgt die Zerstörung ca. 0.7 Mol% oder 21 Mole pro Mol Kollagen, wobei eine gewisse pH-Abhängigkeit festzustellen ist. Der Befund deutet darauf hin, daß die Hydroxysäuren auf diese Weise beträchtlich an der Entstehung unspezifischer Spaltstellen beteiligt sein können. Diese Frage wird im Diskussionsteil (Kap. 3.1.) noch eingehender untersucht werden.

Die durch Umrechnung aus dem Restmethioningehalt erhaltenen Kurven (Abb. 7b) sollten nun übereinstimmen mit denen, die durch die Bestimmung der neu entstehenden Endgruppen mit Ninhydrin erhalten werden (vergl. Versuch 8). Daß dies in recht guter Übereinstimmung der Fall ist, zeigt Abb. 8.

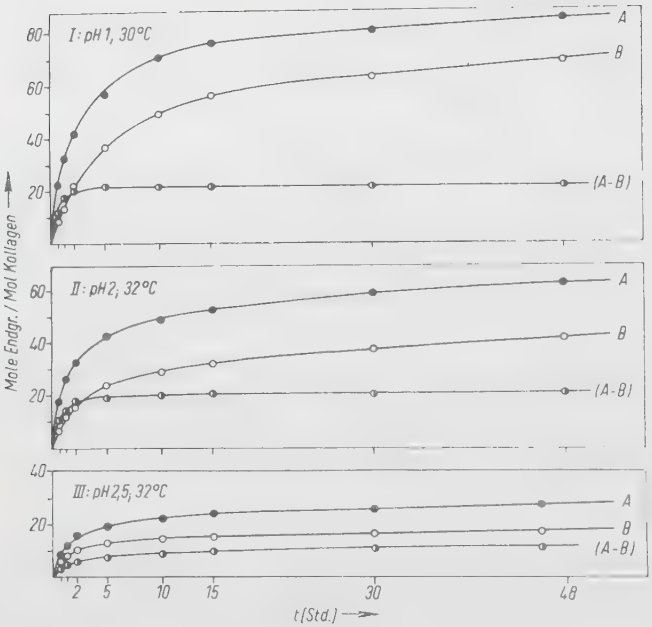


Abb. 8: CNBr-Spaltung von wärmedenaturiertem Kollagen: Zeitliche Verfolgung des Zuwachses an Aminoendgruppen, gemessen durch quantitative Ninhydrinbestimmung; ein Blindwert für unbehandeltes Kollagen wurde berücksichtigt. Kurven A: Ansatz mit 100-fach molarem Überschuß an Bromcyan, berechnet auf Methioninreste pro Mol Kollagen; Kurven B: Gleichbehandelte Ansätze ohne Bromcyan (Kontrollen); Kurven A-B: Durch Subtraktion erhaltene Werte für die methioninspezifische Bromcyanspaltung (entnommen aus Nordwig und Bandlow, 1968).

Die Kurven A-B stimmen mit der theoretischen Voraussage von 18 - 21 Spaltstellen pro Mol Kollagen bei quantitativer Spaltung ebensogut überein wie mit den aus der Aminosäureanalyse abgeleiteten Ergebnissen (Abb. 7b). (Der Berechnung wurde ein Molgewicht von 300 000 für ungespaltenes Kollagen zugrunde gelegt).

Man darf die Genauigkeit der Ninhydrinmethode nicht überbewerten; umso erfreulicher ist deshalb die Übereinstimmung zwischen den aus der Ninhydrinbestimmung erhältlichen Kurven und den Werten, die durch Ermittlung der zeitlichen Abnahme des Methioningehaltes in den Proben durch Aminosäureanalysen errechnet werden können. Die mit völlig verschiedenen Methoden erhaltenen Meßwerte bestätigen sich also gegenseitig.
Die Kurven B zeigen darüberhinaus, daß tatsächlich eine beträchtliche unspezifische Hydrolyse stattfindet. Sie übersteigt nach kurzer Zeit die spezifische Spaltung und beträgt bei pH 2 nach 48 Stunden etwa 2/3, bei pH 1 sogar 80% der Gesamtspaltung. In beiden Fällen verläuft die Umsetzung des Kollagens mit Bromcyan anfangs rascher als die unspezifische Säurehydrolyse (Kurven A-B): Sie ist nach 5 bzw. 10 Stunden beendet, so daß man mit wesentlich kürzeren Reaktionszeiten als den hier angegebenen auskommen und den Hydrolyseanteil beträchtlich reduzieren kann. Die Hydrolyse (Kurven B) beträgt jedoch zu den angegebenen Zeitpunkten nahezu quantitativer Spaltung noch immer 45% bei pH 2 bzw. 65% der Gesamtspaltung bei pH 1. Da eine nichtquantitative Spaltung zugleich eine Erhöhung der Bruchstückzahl und eine Verringerung der Ausbeute je Spaltstück bedeutet (vergl. Kap. 2.1.4.), ist es kaum möglich, aus dem geringen Geschwindigkeitsunterschied der Bromcyanspaltung und der unspezifischen Hydrolyse Nutzen zugunsten der spezifischen Spaltung der Methionylbindung zu ziehen.

Die Bromcyanreaktion verläuft nach der ersten Reaktionsordnung, d.h. der langsamste Reaktionsschritt verläuft

monomolekular oder pseudomonomolekular. Für eine Reaktion erster Ordnung gilt:

$$- \frac{dc}{dt} = k_1 \cdot c \qquad (1)$$

oder für die Zeitabhängigkeit der Konzentration in der integrierten Form:

$$\ln \frac{c_o}{c_t} = k_1 \cdot t \qquad (2)$$

Dabei sind c_o die Anzahl der insgesamt vorhandenen Methionylbindungen pro Mol Kollagen (Ausgangskonzentration) und c_t die zu jedem Zeitpunkt noch spaltbaren Methionylbindungen. Beide Größen lassen sich direkt durch Analyse des Methionins der zeitabhängig entnommenen Proben ermitteln. Trägt man nach Gleichung (2) log c_t gegen t auf (Abb. 9), erhält man eine Gerade mit dem Ordinatenabschnitt c_o zur Zeit t=o. Die negative Steigung der Geraden im halblogarithmischen, natürlichen Koordinatensystem gibt die verschiedenen Reaktionskonstanten an. Man findet $k_{1;30^o}^{pH\ 1} = 4.7 \left[Std^{-1} \right]$ und entsprechend $k_{1;32^o}^{pH\ 2} = 2.8 \left[Std^{-1} \right]$. Die Werte für pH 2.5 streuen sehr stark, so daß von einer graphischen Darstellung abgesehen wurde. Man kann jedoch sehen, daß die Reaktion bei pH 2.5 noch langsamer verläuft als bei pH 2.

Wenn aber die Reaktionsgeschwindigkeit pH-abhängig ist, ist die für die Bromcyanreaktion gemessene Reaktionskonstante offensichtlich eine komplexe Größe. Sie setzt sich zusammen aus der eigentlichen Reaktionskonstanten, der (konstanten) Wasserstoffionenkonzentration und der Dissoziationskonstanten K_a einer zu fordernden protonierbaren Gruppe, die die pH-Abhängigkeit bedingt. Außerdem kann natürlich auch die Konzentration des Bromcyans in die gemessene Konstante eingehen,

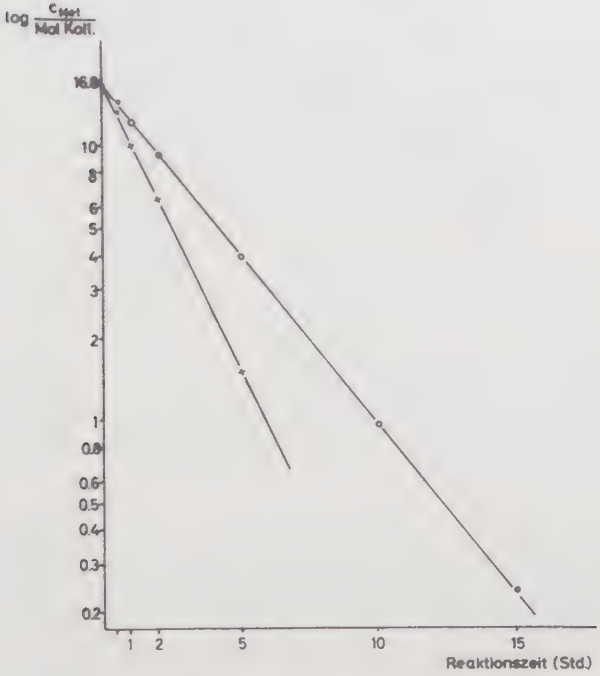


Abb. 9: CNBr-Spaltung von wärmedenaturiertem Kollagen: Auftragung nach der ersten Reaktionsordnung nach Gleichung (2) . x = Ansatz I (pH 1, 30°C), o = Ansatz II (pH 2, 32°C).

da es in sehr großem Überschuß zugesetzt wurde und mithin während der Reaktion nicht abnimmt. Der Ansatz für die gemessene Konstante k_1 muß also lauten:

$$k_1 = f (k_{1\ \text{Reaktion}}, K_a, c_{H^+}, c_{CNBr}).$$

Um die pH-Abhängigkeit der Reaktion zu erklären, muß man an-

nehmen, daß das Methionylpeptid in einer protonierten Form mit dem Bromcyan reagiert, während es im deprotonierten Zustand gegen dessen Angriff stabil ist. Man darf also in der Nähe des pK_a-Wertes dieser protonierbaren Gruppe einen steilen Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit erwarten und vermuten, daß bei pH-Werten, die wesentlich darüber liegen, die Methionylbindungen nicht mehr gespalten werden.

Trifft diese Annahme zu, so sollte die doppelt logarithmische Darstellung der Abhängigkeit der gemessenen Reaktionskonstanten k_1 von der Wasserstoffionenkonzentration die Form einer Titrationskurve besitzen. Die graphische Darstellung der gemessenen k_1 Werte und Abhängigkeit vom pH spricht nicht gegen diese Annahme. Eine eingehendere Prüfung dieser Vermutung ist jedoch kaum möglich, da zu wenige Meßwerte für k_1 zur Verfügung stehen.

Im Diskussionsteil wird versucht werden, eine Erklärung für die pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit zu geben (vergl. Kap. 3.2.).

2.2.2. Spaltungsversuche in Trifluoressigsäure nach Wärmedenaturierung des Kollagens.

Wie man aus Abb. 7 und Abb. 8 entnehmen kann, ergeben bei einer Reaktionstemperatur von etwa 30°C weder die Erhöhung des pH-Wertes, noch eine verkürzte Reaktionsdauer eine wesentliche Verschiebung des Verhältnisses von spezifischer zu hydrolytischer Spaltung zugunsten der Methioninspaltung. So war es notwendig, andere Spaltungsbedingungen zu erproben.

Zunächst bot sich an, in einem Medium zu spalten, das keine Mineralsäure enthielt. Die notwendige H-Ionenkonzentration kann auch durch geeignete organische Säuren gewährleistet werden. Eine ganze Reihe von Arbeitskreisen hatte bereits Spaltungen mit CNBr in (zumeist: 70 %iger) Ameisensäure durchgeführt (Steers et al., 1965; Cahnmann et al., 1965;

Markland und Smith, 1967; Holmgren und Reichard, 1967). Bewährt hat sich jedoch auch Trifluoressigsäure als Medium (Bargetzi et al., 1964; Gregory et al., 1964; Holmgren und Reichard, 1967; Drapeau und Yanofsky, 1967). In der vorliegenden Arbeit wurde das Kollagen nach Wärmedenaturierung in 75 %iger TFA gespalten. Die Versuche wurden wie unter 2.2.1. beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Die Spaltungstemperaturen betrugen 34°C (Ansatz IV) bzw. 20°C (Ansatz V; vergl. auch Versuch 1.3.).

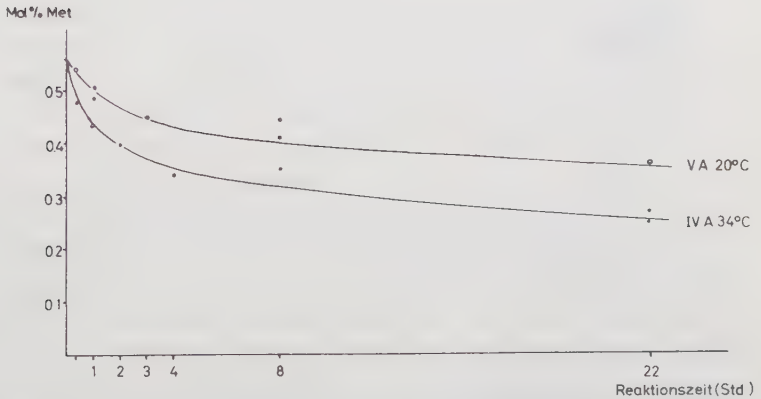


Abb. 10: CNBr-Spaltung von wärmedenaturiertem Kollagen in 75 %iger TFA; Abnahme des Methionins in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Die graphische Darstellung der Methioninabnahme in Abhängigkeit von der Zeit (Aminosäureanalysen werden in Versuch 7 beschrieben) in Abb. 10 zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der im verdünnten Salzsäure - Medium selbst bei 34°C (Ansatz IV) beträchtlich verlangsamt ist. Die Spaltung ist in diesem Falle nach 22 Stunden erst zu 50% abgelaufen. Andererseits zeigt die Bestimmung der ent-

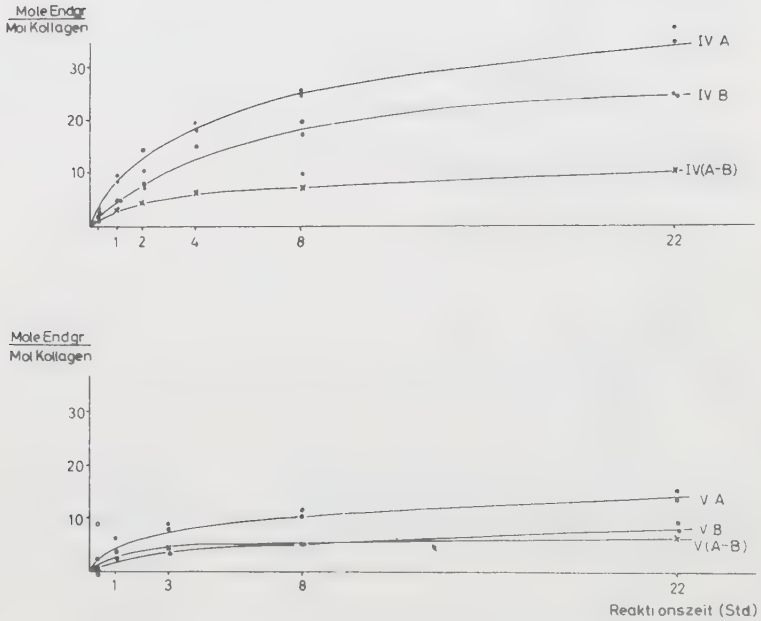


Abb. 11: CNBr-Spaltung von wärmedenaturiertem Kollagen in 75 %iger TFA: Zeitliche Verfolgung des Zuwachses an Aminoendgruppen; quantitative Ninhydrinbestimmung. Ein Blindwert für unbehandeltes Kollagen wurde berücksichtigt. Ansatz IV: 75 %ige TFA, 34°C; Ansatz V: 75 %ige TFA, 20°C. Kurven A: Ansatz mit 0.1 m CNBr (≙ einem etwa 3 000-fach molaren Überschuß, berechnet auf Methioninreste pro Mol Kollagen); Kurven B: gleichbehandelte Ansätze ohne Bromcyan (Kontrollen); Kurven A-B: durch Subtraktion erhaltene Kurve für die methioninspezifische Bromcyanspaltung.

stehenden Endgruppen in Abhängigkeit von der Spaltungsdauer (Abb. 11), daß die unspezifische Hydrolyse keineswegs unterbunden wird. Sie beträgt nach 22 Stunden etwa 2/3 bei 34°C bzw. bei 20°C die Hälfte der Gesamtspaltung; dazu kommt, daß im letzteren Falle die Spaltung der Methionylbindung nur zu 35 % abgelaufen ist (vergl. Versuch 1.3.).

2.2.3. Spaltungsversuche bei Zimmertemperatur nach Salzdenaturierung des Kollagens.

Da nun die hydrolytische Spaltung weder durch pH-Erhöhung noch durch Verkürzung der Reaktionsdauer noch in einem überwiegend nichtwässrigen Medium vermeidbar war, blieb nur übrig, die Reaktionstemperatur zu senken, um diesem Ziel näher zu kommen. Nordwig und Dick (1965) hatten festgestellt, daß erst vorhergehende Denaturierung des Proteins die Reaktion seiner Methionylreste mit dem Bromcyan ermöglicht. Die erhöhte Reaktionstemperatur in den Spaltungsansätzen dient der Verhinderung der Renaturierung, d.h. der Rückbildung der unspaltbaren Konformation. Bei Temperaturen, die tiefer als die in den bisherigen Versuchen benutzten liegen, kann also nur gespalten werden, wenn mit Hilfe von Salzen der denaturierte Zustand während der ganzen Reaktionsdauer aufrechterhalten wird.
Es wurden mehrere denaturierende Agenzien auf ihre Eignung für die Reaktion des Kollagens mit Bromcyan bei tieferer Temperatur untersucht.

Nach den in Kapitel 2.3. noch näher zu beschreibenden Ergebnissen sind für die CNBr-Spaltung bei pH 1 bzw. bei pH 3.3 und 20°C die in Tabelle 5 genannten Konzentrationen an $CaCl_2$ LiBr, GuCl und Harnstoff am besten geeignet, da sie eine vollständige Denaturierung des Kollagens während der gesamten Reaktionszeit gewährleisten. Der Phasenumwandlungsgrad Θ ist also in jedem Ansatz der gleiche, nämlich $\Theta = 1$. (Guanidiniumrhodanid ließ sich nicht verwen-

den, da das Rhodanidion von CNBr unter Schwefelabscheidung langsam oxydiert wurde.) Die Spaltung wurde durchgeführt wie in Versuch 1.4. beschrieben (Ansätze VI - XIII). Die in bestimmten Zeitabständen entnommenen Proben wurden gefriergetrocknet und entsalzt (Versuch 3.3.). In den salzfreien Proben wurde die Spaltung (wie in Versuch 7 beschrieben) durch Analyse des Restgehaltes an Methionin verfolgt (vergl. Abb. 12a und b).
Außerdem wurden die zusätzlich entstehenden Endgruppen gemessen (Ninhydrinanfärbung, Versuch 8). Da die Spaltungsversuche nach Denaturierung mit $CaCl_2$ (Ansätze VI und X) die besten Ergebnisse geliefert hatten, wurden nur sie graphisch dargestellt (vergl. Abb. 13a und b). Die Ergebnisse der übrigen Spaltungsansätze faßt Tabelle 3 zusammen. Darin sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die aus den (nicht abgebildeten) Kinetikkurven erhaltenen Werte nach 22 Stunden Spaltungsdauer verzeichnet.

Aus Tabelle 3 wird die Schwierigkeit der Auswahl geeigneter Spaltungsbedingungen deutlich: bei pH 1 ist die Reaktion nahezu quantitativ verlaufen (Spaltungsausbeute bis zu 95 %), die unspezifische Hydrolyse (vergl. Werte B) ist jedoch etwa ebenso stark wie die spezifische Spaltung (vergl. A-B), macht also jeweils etwa 50 % der Gesamtspaltung aus (vergl. B/A). Am günstigsten ist Ansatz VI (pH 1 Denaturierung mit 1 m $CaCl_2$).
Bei pH 3.3 beträgt zwar die unspezifische Hydrolyse nur noch etwa 16 % der Gesamtspaltung, jedoch ist die spezifische Spaltung unvollständig. Auch bei pH 3.3 liegen die Verhältnisse für die Spaltung nach $CaCl_2$ - Denaturierung (Ansatz X) am günstigsten. Die Übereinstimmung zwischen den aus der Aminosäureanalyse des nicht umgesetzten Methionins und der Ninhydrinbestimmung erhaltenen Ergebnissen ist auch im Falle dieser Spaltungsversuche nach Salzdenaturierung zufriedenstellend (s. Abb. 12 bzw. Abb. 13 und Tabelle 3). Vergleicht man jedoch in Tabelle 3 die nach beiden Methoden gewonnenen Angaben für die spezi-

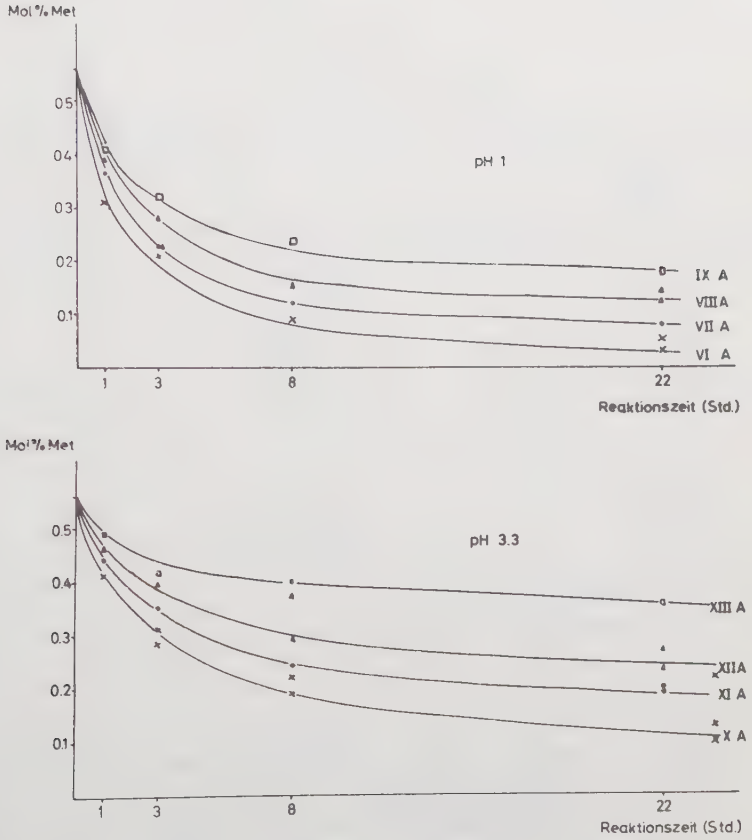


Abb. 12: Bromcyanspaltung von salzdenaturiertem Kollagen: Abnahme des Methionins mit der Reaktionszeit; a bei pH 1, b bei pH 3.3; x $CaCl_2$, o LiBr, △ GuCl und □ Harnstoff. (Die Konzentrationen, die zu vollständiger Denaturierung erforderlich sind, werden in Tabelle 3 und Tabelle 5 aufgeführt.)

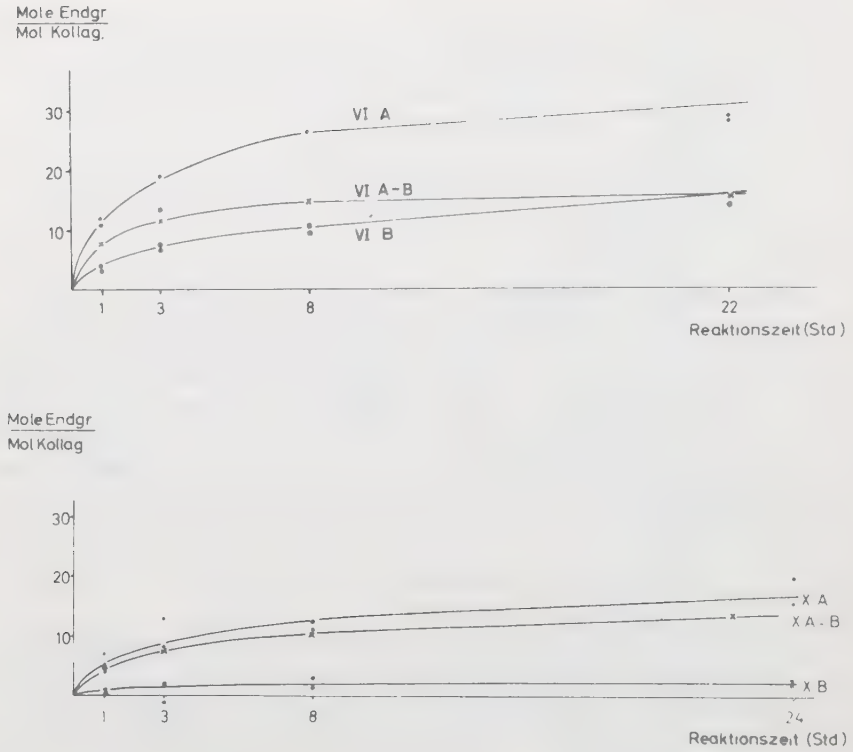


Abb. 13: CNBr-Spaltung von Kollagen, das mit $CaCl_2$ denaturiert worden war (1.0 m $CaCl_2$ bei pH 1 bzw. 1.75 m $CaCl_2$ bei pH 3.3). Zeitliche Verfolgung des Zuwachses an Aminoendgruppen, gemessen durch quantitative Ninhydrin-Bestimmung; ein Blindwert für unbehandeltes Kollagen wurde berücksichtigt. Kurven A: Ansätze mit 0.1 m CNBr (≙ einem 700-fach molaren Überschuß, berechnet auf Methioninreste pro Mol Kollagen); Kurven B: Gleichbehandelte Ansätze ohne Bromcyan (Kontrollen); Kurven A-B: Durch Subtraktion erhaltene Werte für die methioninspezifische Bromcyanspaltung.
Ansatz VI: Spaltung bei pH 1
Ansatz X: Spaltung bei pH 3.3

Tabelle 3: Bromcyanspaltung von salzdenaturiertem Kollagen:

Werte für die Gesamtspaltung (A), unspezifische Hydrolyse (B) und spezifische Spaltung (A-B) nach 22-stündiger Reaktionszeit.
Zahlenangaben in Mole Endgruppen pro Mol Kollagen; (die Werte wurden aus Kinetikkurven entnommen, die durch Endgruppenanfärbung mit Ninhydrin bzw. durch Analyse des Restmethionins erhalten wurden; vergl. Text und Versuch 1.4.). Nach Ergebnissen der Aminosäureanalyse ist für quantitative Spaltung ein Wert von 16.8 Molen Endgruppen pro Mol Kollagen zu erwarten.
Die Konzentrationen an Salz sind jeweils die zu praktischer vollständiger Denaturierung erforderlichen (s. Tabelle 5).

Ansatz	VI	X	VII	XI	VIII	XII	IX	XIII
Denat.mittel	$CaCl_2$		LiBr		GuCl		Ha	
Konz.d.Den.mittels (Mol/l)	1.0	1.75	1.3	2.25	1.5	2.5	4.0	7.0
pH	1	3.3	1	3.3	1	3.3	1	3.3
Mole Endgr. (A)	30.7	16.1	29.4	14.7	27.6	12.9	24.5	9.0
Mole Endgr. (B)	15.0	2.5	14.9	2.5	14.5	2.5	13.6	2.5
Mole Endgr. (A-B)	15.7	13.6	14.5	12.2	13.1	10.4	10.9	6.5
Mole Endgr.a.Met-Best.	15.5	13.8	14.4	11.1	12.9	9.6	10.4	6.0
Ausbeute (%) spez. Spaltung bez. auf Ges.-Met ($\frac{A-B}{16.8}$)	95	82	86	70	74	60	67	38
unspez. Hydrolyse B/A (%)	49	16	50	17	56	19	56	28

fische Spaltung miteinander, so fällt auf, daß die auf der Ninhydrinbestimmung beruhenden Werte häufig etwas höher gefunden werden als die aus der Methioninbestimmung berechneten (vergl. z.B. auch Tabelle 4 bzw. Abb. 7b und Abb. 8). Das kann durch die in sehr begrenztem Umfang auch bei niedrigem pH stattfindende Hydrolyse des Bromcyans erklärt werden.

Bei Betrachtung der graphischen Darstellungen sowie der Daten der Tabelle 3 wird außerdem deutlich, daß die CNBr - Reaktion bei pH 1 wesentlich schneller und vollständiger verläuft als bei pH 3.3. Außerdem sieht man, daß die Reaktionsgeschwindigkeit vom denaturierenden Agens abhängt: Die gefundene Reihenfolge ist $CaCl_2$ > LiBr > GuCl > Harnstoff. Die Spaltung verläuft also um so schneller, je stärker denaturierend das verwendete Salz wirkt, d.h. je weniger Salz zur vollständigen Denaturierung notwendig, also im Spaltungsansatz vorhanden ist. Dieser Sachverhalt wird im Diskussionsteil noch eingehender untersucht werden. (Kap. 3.2.2.).
Ein Anfärbevergleich zwischen $CaCl_2$-denaturiertem Kollagen (Denaturierung bei pH 1 bzw. pH 3.3) und unbehandeltem Kollagen als Standard hat außerdem gezeigt, daß während der 24-stündigen Salzdenaturierung bereits eine begrenzte Hydrolyse stattfindet. Sie beträgt bei pH 1 5.8 Mole und bei pH 3.3 etwa 1.2 Mole pro Mol Kollagen. Den Darstellungen der Endgruppenzunahme mit der Zeit wurde der Anfärbewert für das salzdenaturierte Kollagen zugrunde gelegt; das heißt also, daß die hydrolytische Spaltung insgesamt um 5.8 bzw. 1.2 Mole pro Kollagen höher liegt.

Die vorstehend beschriebenen Ergebnisse der CNBr - Spaltung von Kollagen nach Denaturierung mit $CaCl_2$ stellen die optimalen Bedingungen der Versuchsreihen dieser Arbeit dar. Vergleicht man sie mit den Ergebnissen der anfänglich angewendeten Spaltungsbedingungen (Ansätze I - III; Abb. 8), so ist ersichtlich, daß die unspezifische Hydrolyse be-

trächtlich eingeschränkt werden konnte. Allerdings scheint sie nicht völlig vermeidbar.

2.2.4. Prüfung der als optimal ermittelten Spaltungsbedingungen.

Im voranstehenden Abschnitt war gezeigt worden, daß die Senkung der Reaktionstemperatur die hydrolytische Spaltung stark zurückzudrängen vermag. Allerdings ist bei der tieferen Temperatur die Anwesenheit denaturierender Agenzien erforderlich, um die denaturierte Konformation des Kollagens aufrecht zu erhalten, die ja die Voraussetzung für seine Spaltbarkeit darstellt.

Auch die Spaltungsreaktionen, die im voranstehenden Abschnitt (Kap. 2.2.3.) die besten Spaltungsergebnisse geliefert hatten (20°C; Ansatz VI: Denaturierung mit 1.0 m $CaCl_2$ bei pH 1, Spaltung bei pH 1; bzw. Ansatz X: Denaturierung mit 1.75 m $CaCl_2$ bei pH 3.3, Spaltung bei pH 3.3), waren nicht quantitativ verlaufen. Die Versuche wurden deshalb mit auf quantitative Spaltung extrapolierten Reaktionszeiten (30 Stunden, Ansatz XIV bzw. 72 Stunden Ansatz XV, vergl. Versuch 1.5.) wiederholt. Außerdem wurde in Ansatz XV der pH auf 3.6 erhöht, um die unspezifische Hydrolyse möglichst noch weiter einzuschränken.

Um ferner die bereits während der Salzdenaturierung (20°C; 24stündige Dialyse gegen 1.0 m $CaCl_2$ bei pH 1 bzw. 1.8 m $CaCl_2$ bei pH 3.6) auftretende unspezifische Hydrolyse auszuschalten, wurde in einem weiteren Ansatz (XVI) das Kollagen wärmedenaturiert (pH 3.3, 45°C, 15 Minuten). Erst anschließend wurde der pH gesenkt (pH 1) und das die Renaturierung verhindernde Salz (0.4 m $CaCl_2$) zugefügt (vergl. Versuch 1.6.). Die eingestellte Molarität an $CaCl_2$ entspricht dem für die Halbdenaturierung gefundenen Wert. Sie wurde deswegen geringer gewählt als in den Ansätzen XIV und XV, weil einerseits auch in diesem Medium die Renatu-

rierung stark behindert ist, andererseits aber die Reaktionsgeschwindigkeit der Methioninspaltung wegen der geringeren Salzkonzentration weniger stark herabgesetzt wird. Man kommt also mit kürzeren Reaktionszeiten aus und kann auf diese Weise die unspezifische hydrolytische Spaltung weiter herabdrücken. Die Reaktionszeit für Ansatz XVI betrug 15 Stunden.

In allen drei Ansätzen wurden jeweils nur die Endwerte, also keine Kinetiken gemessen. Das Ausmaß der Gesamtspaltung (Ansätze A) und der unspezifischen Hydrolyse (Ansätze B) wurde mit Ninhydrin bestimmt, wie in Tabelle 2 beschrieben. Die Anfärbung unbehandelten Kollagens wurde in beiden Fällen berücksichtigt. Die spezifische Methioninspaltung (A-B) wurde mit den Werten verglichen, die aus der Analyse des Restmethionins erhalten wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Aus Tabelle 4 ist zu ersehen, daß die Spaltungsreaktion nur in den Ansätzen bei pH 1 (XIV A und XVI A) quantitativ abgelaufen ist. Bei pH 3.6 (Ansatz XV A) ist die Spaltung trotz der langen Reaktionszeit von 72 Stunden unvollständig geblieben. Etwa 30 % des eingesetzten Methionins haben nicht mit CNBr reagiert. Diese Tatsache entspricht den bereits bei den Versuchen ohne Salzzusatz angetroffenen Verhältnissen und scheint darauf hinzudeuten - wie in der Diskussion näher erläutert wird -, daß bei höheren pH-Werten die Reaktion vor Erreichen eines echten Endpunktes zum Stillstand kommt.

Alle Kontrollversuche ohne CNBr (Ansätze B) zeigen, daß sich auch in diesen Versuchen die unspezifische Hydrolyse nicht vermeiden läßt. Sie ist in Ansatz XVI am geringsten. Die Bedingungen dieses Ansatzes (Wärmedenaturierung bei pH 3.3, Spaltung bei pH 1) stellen also die günstigsten dar, die in dieser Arbeit ermittelt wurden. Einerseits wurde in diesem Ansatz nämlich quantitativ gespalten, an-

Tabelle 4: Bromcyanspaltung von $CaCl_2$-denaturiertem Kollagen bei 20°C (vergl. Versuche 1.5. und 1.6.).

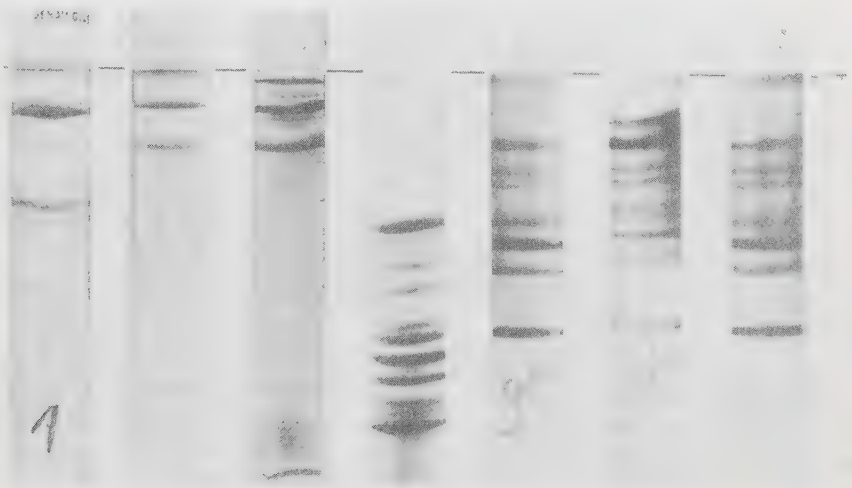
	Denaturierungs-bedingungen			Spaltungs-beding.		Ergebnisse			
	Art	pH	Zeit (Std)	pH	Zeit (Std)	Aminosäure Anal. Mol% Met*	Mole spez. Spaltst.	Endgruppenbest. Mole Endgr.	Mole spez. Spaltst. (A-B)
Versuche mit CNBr XIV A	$CaCl_2$	1	24	1	30	0.00	16.8	39.1	17.6
XV A	$CaCl_2$	3.6	24	3.6	72	0.18	11.4	25.8	12.3
XVI A	Wärme	3.3	0.25	1	15	0.02	16.5	27.0	18.1
Versuche ohne CNBr (Kontrollen) XIV B	$CaCl_2$	1	24	1	30			21.5	
XV B	$CaCl_2$	3.6	24	3.6	72	0.56		13.5	
XVI B	Wärme	3.3	0.25	1	15			8.9	
Kollagen, nur der Denatur. unterworfen XIV C	$CaCl_2$	1	24	-	-			6.9	
XV C	$CaCl_2$	3.6	24	-	-	0.56		1.9	
XVI C	Wärme	3.3	0.25	-	-			0	

* Mittelwerte aus jeweils zwei Bestimmungen (größte Abweichung ± 0.02 Mol%).

Der Rechengang wurde durchgeführt, wie in Tabelle 2 beschrieben. Zur Ermittlung der Extinktion unbehandelten Kollagens als Blindwert aller Versuche wurde der Mittelwert von sechs Bestimmungen aus drei Einwaagen verwendet. Für Ansatz XIV (pH 1) betrug die zur Denaturierung eingesetzte Konzentration 1.0 m $CaCl_2$, für Ansatz XV (pH 3.3) 1.8 m $CaCl_2$. In Ansatz XVI wurde die Kollagenlösung nach der Wärmedenaturierung 0.4 m an $CaCl_2$ gemacht.

dererseits konnte auch die unspezifische Hydrolyse in vertretbaren Grenzen gehalten werden. Sie beträgt hierbei nur noch 33 % der Gesamtspaltung (gegenüber etwa 80 % in Ansatz I bzw. 66% in Ansatz II).

Eine Möglichkeit der qualitativen Überprüfung der Ergebnisse dieses Versuchs bot die Discelektrophorese (s. Abb. 14).



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.

Abb. 14: Discelektrophoretische Kontrolle der in Tabelle 4 zusammengefaßten Spaltungsergebnisse . (Die Abbildungen entstammen nicht identischen Läufen; vergl. Versuch 6).

1. Wärmedenaturiertes Kollagen (Denaturierung bei pH 3.3 und 45°C, 15 Minuten; Discelektrophoresebedingungen: 0.35 m ß-Alaninpuffer, pH 4.8, 15 Stunden Laufzeit; vergl. Abb. 6).
2. Wärmedenaturiertes Kollagen (Ansatz XVI C: Denaturierung wie Nr. 1; Discelektrophorese: 0.35 m ß-Alaninpuffer, pH 4.3, Laufzeit 6 Stunden).

3. Salzdenaturiertes Kollagen (Ansatz XIV C: Denaturierung mit 1.0 m $CaCl_2$ bei pH 1 und 20°C, 24 Stunden; Discelektrophorese: Ameisensäure-Essigsäurepuffer, pH 1.8, Laufzeit 2.5 Stunden).

Mit Bromcyan gespaltenes Kollagen:

4. Ansatz unter Bedingungen, die in Kap. 2.1. beschrieben wurden (Wärmedenaturierung wie Nr. 1; Spaltung bei pH 2 und 32°C, 48 Stunden; Elektrophoresebedingungen wie Nr. 3, Laufzeit 4 Stunden).
5. Ansatz XIV A (Salzdenaturierung wie Nr. 3; Spaltung bei pH 1 und 20°C, 30 Stunden; Elektrophoresebedingungen wie Nr. 3, Laufzeit 2 Stunden).
6. Ansatz XV A (Salzdenaturierung mit 1.8 m $CaCl_2$ bei pH 3.6 und 20°C, 24 Stunden; Spaltung bei pH 3.6 und 20°C, 72 Stunden; Elektrophoresebedingungen wie Nr. 3, Laufzeit 2 Stunden).
7. Ansatz XVI A (Wärmedenaturierung wie Nr. 1; Spaltung bei pH 1 und 20°C, 15 Stunden; Elektrophoresebedingungen wie Nr. 3, Laufzeit 2 Stunden).

Vergleicht man in Abb. 14 die CNBr-Abbaugemische, die unter den anfänglichen Spaltungsbedingungen (pH 2, 32°C, 48 Stunden; Gel Nr. 4) erhalten worden waren, mit denen von Ansatz XIV (Salzdenaturierung und Spaltung bei pH 1 und 20°C, 30 Stunden; Gel Nr. 5) bzw. von Ansatz XVI (Wärmedenaturierung bei pH 3.3, Spaltung bei pH 1 und 20°C, 15 Stunden; Gel Nr. 7), so kann man ersehen, daß die Zahl der Banden von etwa 24 in Röhrchen 4 (vergl. Kap. 2.1.) auf etwa 10 in diesen Röhrchen 5 und 7 zurückgegangen ist. Auch die unspezifische Untergrundfärbung wurde im Gel Nr. 7 der Abb. 14 geringer gefunden als in den Gelen Nr. 5 oder Nr. 6, was jedoch aus der Abbildung nicht deutlich hervorgeht. Auch dieser Befund deutet auf eine geringere Hydrolyse im Ansatz XVI hin.
Das Röhrchen Nr. 6 (Ansatz XV) zeigt noch zwei Banden,

die etwa an der Stelle der α-Banden des Ausgangskollagens liegen. Da in diesem Gel keine ß- und γ-Banden nachweisbar sind, handelt es sich vermutlich um eine Abspaltung der die intramolekulare Quervernetzung enthaltenden N-terminalen Sequenz, wobei Restbruchstücke entstehen, die sich wie verkürzte α-Ketten verhalten (Bornstein, 1966 a und b).

Aus der Abbildung des Röhrchens Nr. 3 ist ferner deutlich zu ersehen, daß während der Salzdenaturierung bereits eine Hydrolyse stattfindet.

2.3. Salzdenaturierungen.

Um die Spaltung des Kollagens bei Raumtemperatur durchführen zu können, ist es notwendig, die spaltbare Knäuel-Konformation durch Zugabe von Denaturierungsmitteln aufrecht zu erhalten. Im folgenden werden einige Agenzien auf ihre Denaturierungswirksamkeit und ihre Eignung für die anschließende CNBr-Reaktion untersucht.

Die Gleichgewichtsdenaturierung eines Proteins wird durch drei Parameter bestimmt: die Temperatur, die Salzkonzentration und den pH. Ihre Wirkungen verhalten sich additiv. Es ist daher erforderlich, einen von ihnen festzulegen, um die Abhängigkeit der beiden übrigen voneinander messen zu können.

Hippel und Wong (1962, 1963 a und b) hatten festgestellt, daß die Denaturierungstemperatur bei konstantem pH mit zunehmender Salzkonzentration für das Kollagen linear abfällt. Dick und Nordwig (1966) bestimmten den Zusammenhang zwischen der Denaturierungstemperatur des Kollagens und dem pH bei gleichbleibender Ionenstärke.

In diesem Kapitel soll nun die Abhängigkeit der zur Denaturierung erforderlichen Salzkonzentration von der Wasserstoffionenkonzentration bei konstant gehaltener Temperatur für einige Salze untersucht werden.

Um eine vollständige Spaltung mit CNBr zu erzielen, war es einerseits erforderlich, quantitativ zu denaturieren. Andererseits sollte möglichst wenig Salz eingesetzt werden, um die spätere Entsalzung des Abbaugemisches nicht unnötig zu erschweren. Aus diesem Grunde wurden bei einer vorgegebenen Temperatur von 20°C isotherme Denaturierungskurven in Abhängigkeit von der Salzkonzentration aufgenommen, um die zu vollständiger Denaturierung minimal notwendigen Salzmengen zu ermitteln.

Als denaturierende Agenzien wurden eingesetzt: $CaCl_2$, LiBr, Guanidiniumrhodanid, Guanidiniumchlorid und Harnstoff. Sie enthalten alle (bis auf Harnstoff) kräftig denaturierende Ionen (Hippel und Wong, 1962). Der Harnstoff wurde verwendet, weil er sich als Denaturierungsmittel in vielen Fällen bewährt hat. Die Denaturierungskurven wurden bei pH 1 und pH 3.3 aufgenommen (Abb. 15). Der Denaturierungsvorgang wurde durch die Abnahme der negativen optischen Drehung verfolgt (Versuch 12.1.).

Bei Zugabe der stark polarisierenden Salze LiBr, $CaCl_2$ und auch GuSCN (nur bei pH 3.3) zu den Kollagenlösungen fielen Fibrillen aus, so daß eine vollständige Verfolgung der Drehwertänderungen nicht möglich war. Als Endwert der Denaturierung wurde der Punkt angenommen, an dem bei sehr langsamer, stufenweiser Erhöhung der Salzkonzentration (0.05 - 0.1 Mol pro Tag) die Fibrillen wieder vollständig in Lösung gegangen waren. Die langsame Konzentrationserhöhung sollte die Einstellung des Denaturierungsgleichgewichtes ermöglichen. Die Ermittlung der zur Denaturierung erforderlichen Salzmengen nach diesem Verfahren ist zwar nicht exakt, stellt aber eine gute Kompromißlösung für alle diejenigen Fälle dar, bei denen die Denaturierungskurve nicht vollständig gemessen werden kann.

Ich bin mir bewußt, daß die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse und die daraus gezogenen Folgerungen wegen des

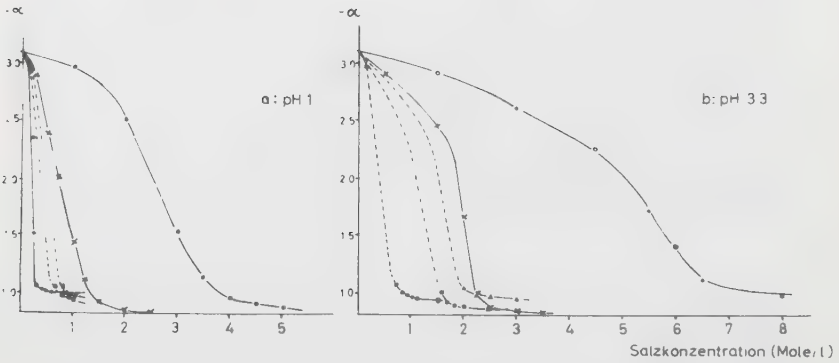


Abb. 15: Isotherme Denaturierungskurven von Kollagen: Änderung der optischen Drehung einer Kollagenlösung in Abhängigkeit von der Konzentration an denaturierenden Salzen nach Einstellung des Denaturierungsgleichgewichtes (bei 20°C): • GuSCN, □ $CaCl_2$, △ LiBr, x GuCl und o Harnstoff; die Kurven der Abb. 15a wurden bei pH 1, von Abb. 15b bei pH 3.3 gemessen.

vorstehend beschriebenen Mangels anfechtbar sind. Sie besitzen jedoch einen hohen Wahrscheinlichkeitsgrad, da bei den Messungen sehr genau darauf geachtet wurde, daß sich der Gleichgewichtszustand zwischen Protein und Denaturierungseinflüssen eingestellt hatte. Die Einschränkung des Aussagewertes gilt nur für die Salze GuSCN, $CaCl_2$ und LiBr und hauptsächlich für die ermittelte pH-Abhängigkeit der Denaturierungskonzentration.

Die Untersuchungen über die Salzdenaturierung wurden auch weniger des Selbstzwecks wegen unternommen, sie sollten vielmehr in erster Linie als Grundlage für die Spaltung des Kollagens mit CNBr bei tieferer Temperatur dienen.

Die Tabelle 5 gibt nun die zu praktisch vollständiger Denaturierung notwendigen Konzentrationen für die einzelnen Salze an, die als Kurvenknickpunkte aus Abb. 15 ermittelt wurden.

Tabelle 5: Zur Denaturierung erforderliche Salzkonzentrationen bei pH 1 und pH 3.3.

pH	GuSCN	$CaCl_2$	LiBr	GuCl	Ha
1	0.4	1.0	1.3	1.5	4.0
3.3	0.75	1.75	2.25	2.5	7.0

Abb. 15 und Tabelle 5 zeigen, daß Guanidiniumrhodanid am stärksten denaturierend wirkt, gefolgt von $CaCl_2$, LiBr, GuCl und Harnstoff. Sie zeigen jedoch ferner, daß auch die Salzdenaturierung pH-abhängig ist und somit eine erwartete Analogie zur Wärmedenaturierung bildet (vergl. Dick und Nordwig, 1966).

Die Denaturierungstemperatur T_m wird durch die von Hippel und Wong (1962) aufgestellte Gleichung

$$T_m = T_m^o + K.c \qquad (3)$$

mit der Salzkonzentration c verknüpft. T_m^o ist die Denaturierungstemperatur bei salzfreiem Medium. K ist ein als Denaturierungskonstante bezeichneter Proportionalitätsfaktor, der für jedes Salz eine charakteristische Größe hat, also das Denaturierungsvermögen eines bestimmten Salzes beschreibt. Gleichung (3) gilt nur bei konstantem pH; sie gilt nicht für die Abhängigkeit der Denaturierungstemperatur von der Wasserstoffionenkonzentration, wie aus der Arbeit von Dick und Nordwig (1966) zu schließen ist.

In Analogie zu den Verhältnissen bei der Wärmedenaturierung erscheint es notwendig, bei der Denaturierung mit Salzen diejenige Konzentration als Denaturierungskonzentration c_m zu definieren, bei der der Phasenumwandlungsgrad Θ für die Kollagenmoleküle 0.5 beträgt.

In den Veröffentlichungen von Hippel und Wong (1962, 1963 a) wurde T_m^o (= f(pH)) konstant gehalten und T_m in Abhängigkeit von c bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Denaturierungstemperatur T_m festgelegt (20°C) und c_m in Abhängigkeit vom pH in parallelen Versuchsreihen bestimmt, also die durch eine Erhöhung der Salzkonzentration hervorgerufene isotherme Denaturierung bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Für die bei der Salzdenaturierung konstante Temperatur wird Gleichung (3) entsprechend modifiziert:

$$T = T_m^o + K \cdot c_m \qquad (4)$$

oder

$$c_m = \frac{T - T_m^o}{K} = \frac{\Delta T}{K} \qquad (5)$$

c_m ist die in dieser Arbeit definierte Denaturierungskonzentration. Gleichung (5) gilt - genau wie Gleichung (3) - nur für eine konstante H-Ionenkonzentration, da sich T_m^o (Dick und Nordwig, 1966) und mithin auch K und c_m in Abhängigkeit vom pH ändern:

$$T_m^o,\ c_m \text{ und } K = f\ (\ pH\ ).$$

Es wurden wiederum isotherme Gleichgewichtskurven aufgenommen. Zur Kontrolle dafür, daß vor jeder Messung sich

das der Salzkonzentration entsprechende Denaturierungsgleichgewicht eingestellt hatte, wurde zuvor nach jeder Salzzugabe die Veränderung des Drehwinkels in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt.

Die Zeitabhängigkeit der Drehwinkeländerung ist am Anfang und Ende der Denaturierungskurve gering; das Gleichgewicht stellt sich also rasch ein (Abb. 16). In der Nähe der Denaturierungskonzentration c_m erfolgt die Gleichgewichtseinstellung wesentlich langsamer. In diesem Bereich wurde in den folgenden Versuchen 18 - 24 Stunden von der Konzentrationserhöhung bis zur Messung gewartet. In diesem Versuch wurde jedoch - im Gegensatz zu den folgenden, in Abb. 17 dargestellten Versuchen - mit festem Denaturierungsmittel versetzt, um die Änderung der optischen Drehung unmittelbar nach der Zugabe verfolgen zu können.

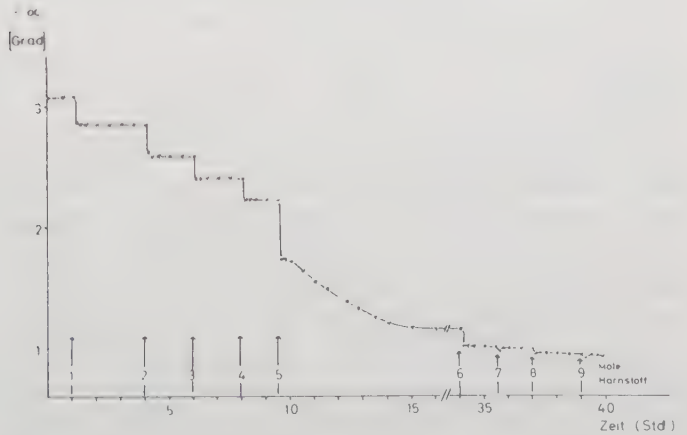


Abb. 16: Einstellung des Denaturierungsgleichgewichtes von Kollagenlösungen in Abhängigkeit von der Zeit nach isothermer Erhöhung der Konzentration für Harnstoff bei pH 3 und 20°C .

Bei Durchführung des gleichen Versuches mit Guanidiniumrhodanid bei pH 1.5 machte sich wiederum ein Aussalzeffekt bemerkbar. Er führte bei einer Konzentration von 0.3 Molen pro Liter zur Abscheidung von Fibrillen, so daß die zeitliche Abhängigkeit der Änderung der optischen Drehung nicht weiter verfolgt werden konnte. Dieser Effekt machte sich auch bemerkbar, wenn die Denaturierung durch Dialyse der Kollagenlösungen gegen GuSCN-Lösungen steigender Konzentrationen verfolgt wurde, so daß auch diese Kurven nur sehr unvollständig gemessen werden konnten. In den folgenden Versuchen wurde deshalb wiederum durch sehr langsame Erhöhung der Konzentration an Guanidiniumrhodanid (0.05 Mol pro Tag) der Punkt, an dem die Fibrillen erneut völlig in Lösung gegangen waren, recht genau ermittelt und der zugehörige Drehwinkel gemessen. Das fehlende Kurvenstück wurde unter Zugrundelegung der für diese Übergänge bekannten, sigmoiden Kurvenform interpoliert. Die Denaturierungskonzentration wurde dann als Mittelpunkt des Phasenüberganges zeichnerisch ermittelt. Das scheint auch durch die Analogie zu den bei der Harnstoffdenaturierung gefundenen Kurven gerechtfertigt.

Um die pH-Abhängigkeit der Denaturierungskonzentrationen der verwendeten Salze zu messen, war es ferner notwendig, Volumenveränderungen zu vermeiden, die bei Zugabe festen Salzes eintreten; die "Verdünnung" der Proteinlösung durch Salze bewirkt bereits ein Absinken des Drehwinkels, das sich in einer Verbreiterung der Kurve in der Konzentrationsachse äußert. Wegen der geringen Denaturierungswirksamkeit des Harnstoffes, d.h. der erforderlichen großen Menge, ist daher aufgrund dieses "Verdünnungseffektes" der Unterschied der Kurvenverläufe hierbei besonders deutlich (vergl. Abb. 15 und Abb. 17): Bei dem in Abb. 15 dargestellten Versuch wurde durch Zugabe festen Salzes denaturiert; um bei den folgenden Untersuchungen (Abb. 17) Volumenänderungen zu unterdrücken, wurde gegen einen Puffer dialysiert, der die denaturierenden Salze in den entspre-

chenden Konzentrationen enthielt. Osmotische Verluste wurden durch Puffer der Vorlage ausgeglichen (vergl. Versuch 12).
Hippel und Wong (1963 a, Seite 1392) hatten für die Denaturierung mit Harnstoff bei pH 7 eine ähnlich flache Kurve wie die in Abb. 15 dargestellte erhalten. Es ist daher anzunehmen, daß die Autoren diesen Verdünnungseffekt nicht berücksichtigen. Die weitere Zugabe von Harnstoff nach Erreichen des Zustandes vollständiger Denaturierung täuscht demzufolge eine weitere Abnahme des Drehwinkels vor. Diese ist jedoch nicht real, wie Abb. 17b für den Harnstoff zeigt.

Abb. 17a und Abb. 17b zeigen die Schar der bei verschiedenen pH-Werten ermittelten Denaturierungskurven für Guanidiniumrhodanid und Harnstoff. Es wurde der Drehwinkel gegen die Konzentrationen an Denaturierungsagens aufgetragen.

Die aus Abb. 17 sich ergebende Abhängigkeit der c_m-Werte für GuSCN und Harnstoff vom pH des Mediums ist in Abb. 18 dargestellt. Außerdem sind die aus Abb. 15a und 15b erhaltenen c_m-Werte für $CaCl_2$, LiBr und GuCl eingezeichnet.

Man sieht recht deutlich, daß für alle vier Salze ein linearer Zusammenhang zwischen c_m und pH zu bestehen scheint. Für Harnstoff wird eine doppel-S-förmig gebogene Kurve erhalten. Alle Kurven schneiden die Abszisse in einem Punkt. Dieses Ergebnis ist keineswegs überraschend, da in salzfreiem Medium ($c_m = o$) der Denaturierungszustand bei vorgegebener Temperatur nur vom pH-Wert abhängt. Bei pH -0.7, also einer H-Ionenkonzentration von etwa fünf Molen pro Liter, und 20°C scheint die 50 %ige Phasenumwandlung also allein durch die H_3O^+ -Ionen herbeigeführt zu werden.

Aus der graphischen Darstellung in Abb. 18 läßt sich ein

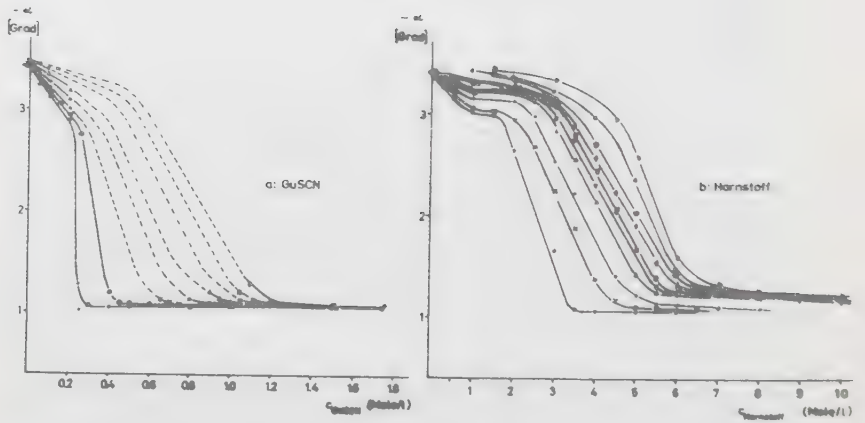


Abb. 17: Schar isothermer Denaturierungskurven: Dargestellt wurde die Abhängigkeit des Denaturierungsgrades (= f($-\alpha$)) von der Salzkonzentration bei verschiedenen pH-Werten:

Abb. 17a für GuSCN: Drehwinkelabnahme bei: . pH 1, ⊙ pH 1.5, x pH 2, o pH 3, △ pH 3.3, ▽ pH 4, □ pH 4.5 und ◇ pH 5.

Abb. 17b für Harnstoff: Drehwinkelabnahme bei: . pH 1, x pH 2, o pH 3, △ pH 3.3, ▽ pH 4, □ pH 4.5, ◇ pH 6, ● pH 7, ◐ pH 8 und ▷ pH 9.

(in Abb. 17b wurden die bei pH 5.0, pH 5.3, pH 5.6, pH 6.5 und pH 7.5 erhaltenen Kurven aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen).

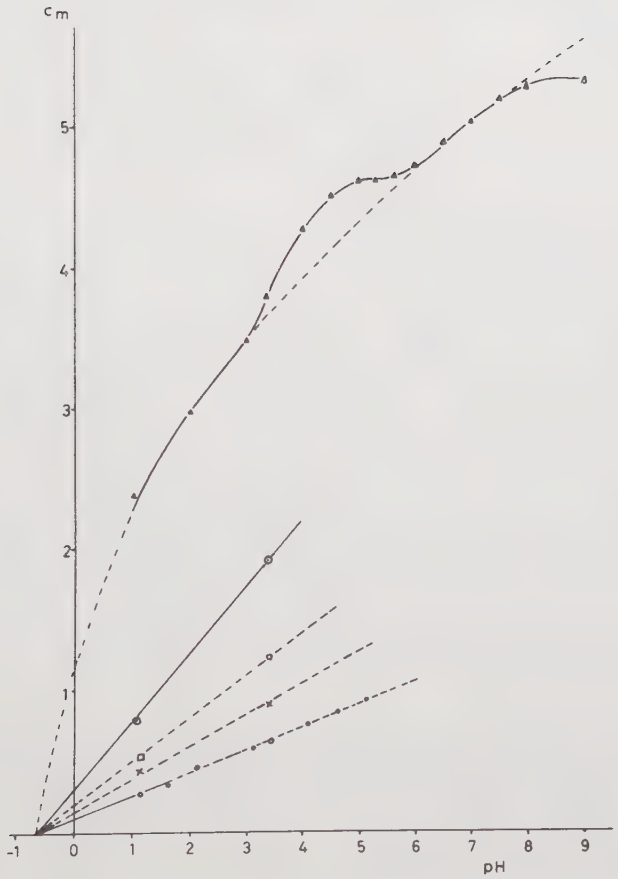


Abb. 18: pH-Abhängigkeit der Denaturierungskonzentration c_m für o GuSCN, x $CaCl_2$, □ LiBr, ⊙ GuCl und △ Harnstoff.

formelmäßiger Zusammenhang zwischen dem pH und der Denaturierungskonzentration c_m für ionische Agenzien wie folgt herleiten:

$$c_m = c_m^o + K' \cdot pH \qquad (6)$$

Für eine bestimmte Temperatur ist in Gleichung (6) c_m die Denaturierungskonzentration, die Konstante c_m^o die Denaturierungskonzentration bei pH 0 und K' die pH-Abhängigkeitskonstante. Auffallend ist die Analogie zwischen Gleichung (6) und der von Hippel und Wong (1962) aufgestellten Gleichung (3), die die Abhängigkeit der Denaturierungstemperatur von der Ionenkonzentration des Mediums beschreibt. Anders als das c der Gleichung (3) (vergl. Seite 65) ist der pH allerdings eine logarithmische Größe und c_m^o relativ unbedeutend im Gegensatz zu T_m^o, der Denaturierungstemperatur für Kollagen in salzfreiem Medium. Mit K' ist eine Salzkonstante gefunden, die pH-unabhängig ist im Gegensatz zum K der Gleichung (3). K' beschreibt ebenfalls eine Salzeigenschaft: die pH-Abhängigkeit von c_m ist umso größer, je größer K' ist.

In der folgenden Tabelle 6 sind die aus Abb. 18 erhältlichen pH-Abhängigkeitskonstanten K' und die c_m^o-Werte für die einzelnen Salze aufgeführt:

Agens	GuSCN	$CaCl_2$	LiBr	GuCl	Ha
K'	0.16	0.22	0.30	0.46	1.8
c_m^o	0.10	0.15	0.20	0.3	1.45

Wie aus Abb. 18 ersichtlich, ist die Denaturierungskonzentration c_m der Gleichung (6) nur für ionische Salze eine lineare Funktion des pH, für Harnstoff jedoch eine hyperbolische. Trägt man empirisch c_m^n gegen den pH-Wert auf,

so zeigt sich, daß alle Kurven mit $n < 2$ einen konkaven, mit $n > 2$ einen konvexen Verlauf besitzen. Hingegen ist die graphische Darstellung von c_m^2 gegen pH linear (vergl. Abb. 19) und liefert wiederum den Abszissenabschnitt pH -0.7 (vergl. Abb. 18). K' und c_m^o sind dann die Wurzeln aus der Steigung bzw. dem Ordinatenabschnitt der Abb. 19.

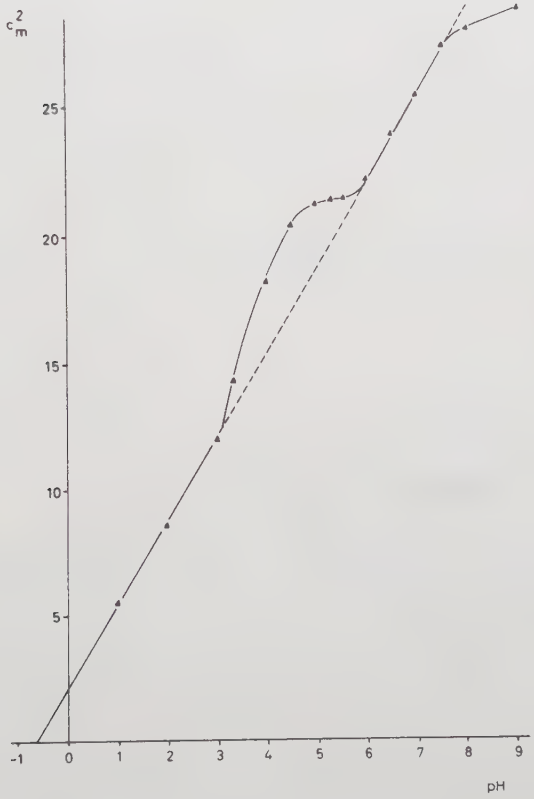


Abb. 19: pH-Abhängigkeit der Denaturierungskonzentration c_m für Harnstoff.

Die Abweichung der gemessenen Werte vom berechneten Kurvenverlauf zwischen pH 3 und pH 6 und oberhalb von pH 7.5 (vergl. Abb. 18 und Abb. 19) scheint in dem Einfluß des Ladungszustandes des Proteins auf die Harnstoffdenaturierung begründet zu sein. Eine Interpretation des Verlaufs der pH-Abhängigkeitskurve der Denaturierungskonzentration von Harnstoff wird im Diskussionsteil versucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die pH-Abhängigkeit von c_m ermittelt. Dick und Nordwig (1966) geben in ihrer Arbeit die pH-Abhängigkeit der Denaturierungstemperatur T_m^o an.* Mit Hilfe beider Größen und Gleichung (4) (Seite 66) läßt sich nun die Denaturierungskonstante K für die verwendeten Salze bei verschiedenen pH-Werten ermitteln. Das Ergebnis ist in Tabelle 7 zusammengestellt.

Die Tabelle zeigt, daß die Denaturierungskonstanten K sich mit der Wasserstoffionenkonzentration ändern. Diese Abhängigkeit wird im Diskussionsteil noch eingehender untersucht.

2.4. Analytisches

2.4.1. Trennungen an Sephadex.

Sephadex ist ein vernetztes Dextran-Material. Es besitzt zahlreiche Hydroxylgruppen, ist also keinesfalls inert. Es fraktioniert das Trenngut nach dessen Molekülgröße durch einen Siebeffekt: große Partikel wandern mit der Pufferfront, während kleinere in die Poren und Hohlräume der Gelkörner hineindiffundieren und gegenüber der Elutionsfront

---

* Die Autoren ermittelten T_m in Abhängigkeit vom pH in einer NaCl/HCl-Lösung der konstanten Ionenstärke I = 0.1. Da für NaCl jedoch $K \cong o$ ist, also keine Wechselwirkung zwischen Salz und Kollagenmolekül besteht, ist die gemessene Denaturierungstemperatur $T_m \cong T_m^o$.

Tabelle 7: c_m-Werte und Denaturierungskonstanten K in Abhängigkeit vom pH für eine Denaturierungstemperatur $T_m = 20^oC$; (c_m ist eine Meßgröße).

Agens		GuSCN		$CaCl_2$		LiBr		GuCl		Ha	
pH	T_m^{o*}	c_m	K	c_m	K	c_m	K	c_m	K	c_m	K
9										5.35	-3.55
8										5.30	-3.58
7.5										5.20	-3.65
7	39									5.05	-3.76
6.5										4.90	-3.88
6	38.9									4.71	-4.01
5.6										4.65	-4.05
5.3										4.63	-4.05
5	38.7	0.88	-21.2							4.62	-4.05
4.5	38.3	0.80	-22.9							4.51	-4.05
4.	37.7	0.72	-24.6							4.37	-4.05
3.3	35.3	0.61	-25.1	0.85	-18.0	1.2	-12.8	1.90	- 8.1	3.78	-4.05
3	34.1	0.56	-25.2							3.45	-4.08
2	32.1	0.42	-28.8							2.95	-4.10
1	32.0	0.24	-50.0	0.40	-30.0	0.5	-24.0	0.75	-16.0	2.35	-5.10

* Die T_m^o-Werte wurden der Arbeit von Dick und Nordwig (1966) entnommen.
Die von Hippel und Wong (1962 bzw. 1963 a) für pH 7 veröffentlichten Konstanten stimmen recht gut mit den Werten dieser Tabelle überein.

verzögert werden. In jedem Fall kann das Trenngut mit den Hydroxylgruppen der Sephadex - Matrix in Wechselwirkung treten, die umso stärker ist, je polarer seine funktionellen Gruppen sind. Dieser Effekt bewirkt, daß die Elution zusätzlich verzögert und die Proteinbande diffus und breit wird.

Dieser lästige Effekt der verschleppten Elution von Sephadex-Säulen machte sich in der vorliegenden Arbeit mehrfach bei der Fraktionierung von Kollagenbruchstücken bemerkbar:

Im Kapitel 2.1.3. war eine Kollagenfraktion beschrieben worden, die saure (insgesamt 16.5 Mol%) und aromatische (insgesamt 2.9 Mol %) Aminosäuren sehr stark angereichert enthielt (Fraktion 5 des Trennschemas, Seite 32). Diese Fraktion war bei der Entsalzung an Sephadex G 25 so sehr verschleppt eluiert worden, daß ihr Peak erst nach dem Salz ($CaCl_2$ bzw. NaCl) erschien. Keiner der Peaks dieser Elution war homogen; jeder enthielt Material benachbarter, aber auch entfernterer Gipfel.

Die gleiche Feststellung wurde bei dem Versuch der Fraktionierung eines Dialysates von CNBr-Abbaupeptiden an Sephadex G 25 gemacht. Der schmalste und aussichtsreichste der 7 eluierten Peaks enthielt 10 bis 12 der insgesamt 16 im Dialysat durch Dünnschichtchromatographie und Discelektrophorese nachweisbaren Komponenten.

In einem weiteren Experiment war versucht worden, mit Kollagenase gewonnene Abbaupeptide von Kollagen in langen, engen Säulen an Sephadex G 10 und G 15 (130 x 1 cm) aufzutrennen. Entsprechend ihrer Spezifität verdaut die Kollagenase die apolaren Bereiche nativen Kollagens zu Tripeptiden der Sequenz Gly-Pro-X, während die polaren Bereiche unangetastet bleiben. Aufgrund der Molekulargewichtsunterschiede sollte es gelingen, diese verschieden langen Peptide an hochvernetztem Sephadex zu trennen. Mehrere Versuche (s. z.B. Versuch 3.4.) haben jedoch gezeigt, daß die Trennung der apolaren Tripeptide von den längeren Fragmenten polarer

Bereiche nicht möglich ist, wie auch Nordwig (1961), Franzblau (1962) und Franzblau et al. (1964) gefunden hatten.

In gesonderten Versuchen war ferner festgestellt worden, daß vor allem dinitrophenylierte und "DANSylierte" Peptide außerordentlich langsam von Sephadex eluiert werden. Als Mechanismus kann man sich die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den im Dextran reichlich vorhandenen Hydroxylgruppen und freien Carboxylfunktionen der sauren Seitenketten bzw. den Nitro- und Sulfonsäuregruppen der Peptide vorstellen.

Die Befunde scheinen also die Behauptung von Gelotte (1960) und Porath (1960) zu bestätigen, daß Peptide, die überwiegend polare oder aromatische Aminosäuren enthalten, teilweise an dem Sephadexmaterial absorbiert und deshalb verschleppt eluiert werden. Diese Absorptionseffekte an Sephadex bedürfen jedoch noch eingehender und systematischer Untersuchungen.

2.4.2. Die Discelektrophorese.

Zur Bestimmung der Zahl der verschiedenen Bruchstücke in einem Peptidgemisch und zur Kontrolle der Wirksamkeit einer präparativen Trennmethode war es notwendig, ein einfaches und schnelles analytisches Verfahren einzusetzen. Als geeignet, da außerordentlich empfindlich und rasch durchführbar, hat sich in den beschriebenen Versuchen die Discelektrophorese erwiesen. Seit Einführung des Polyacrylamidgels durch Raymond und Weintraub (1959) hat sie sich in zunehmendem Maße bei der Untersuchung komplexer Proteingemische bewährt.

Durch diese Methode werden die Proteine oberhalb eines Trenngels in sehr schmalen Startzonen konzentriert und dann durch gemeinsame Wirkung von Elektrophorese und Molekularsiebeffekt aufgetrennt. Als die Banden konzentrierende, zusätzliche Effekte gegenüber der Gelelektrophorese in Stärkegel (Smithies, 1959; Näntö et al., 1963, 1965) wurden von Ornstein und Davis (1961, veröff. 1964) pH- und Ionenbeweglichkeitsgradienten innerhalb der Gelsäule und gegenüber dem Puffer der Elektroden-

kammern eingeführt, die bei Anlegen einer Spannung den Aufbau eines Spannungsgradienten bewirken. Der Potentialabfall entsteht durch die Verwendung eines Gelpuffers mit großer Ionenbeweglichkeit ("Trailing Ion") und eines Elektrodenpuffers, dessen Ionen aufgrund ihrer geringen Dissoziation bei gegebenen pH eine niedrige Beweglichkeit besitzen. Zwischen beiden ordnen sich die Proteinbanden gemäß ihrer Ionenbeweglichkeiten und wandern in das Gel ein. Verursacht durch den pH-Sprung dissoziiert das Ion des Elektrodenpuffers bei dem pH des Gels stärker und gewinnt eine dem Trailing Ion gleiche Mobilität. Die weitere Auftrennung der Proteinbanden erfolgt in einer normalen Gelelektrophorese.

Für den Elektrodenpuffer wurde bei der Auftrennung der Kollagenuntereinheiten zumeist das System von Reisfeld et al. (1962) verwendet (vergl. Versuch 6), das hierbei die besten Ergebnisse lieferte. Dabei erwies es sich als vorteilhaft, die Gele 1 - 2 molar an Harnstoff zu machen, um die Renaturierung zu verhindern.

Für Abbaupeptide wurde unter diesen Bedingungen (Verwendung eines 7.5 %igen Gels für die Auftrennung denaturierten Kollagens) jedoch stets nur eine diffuse Bande erzielt. Da die Bruchstücke aber sehr viel kleinere Molekulargewichte besitzen sollten als die Kollagenuntereinheiten, wurde zunächst durch Erhöhung der Polyacrylamidkonzentration und des Vernetzungsgrades, der durch den Gehalt an N,N'-Methylen-bis-acrylamid bestimmt wird, die Porengröße herabgesetzt. Die Erhöhung des Vernetzungsgrades hatte nur Einfluß auf die innere Festigkeit der Gelzylinder und führte zu Sprödigkeit und Trübung des Gels. Die Porenweite wird hauptsächlich durch das dreidimensionale Netzwerk der Polyacrylamidketten bestimmt. Optimal erwies sich eine Konzentration von 15 % des Monomeren.
Zwar wurden die Peptide nun besser getrennt, die Banden blieben jedoch unscharf. Einen zusätzlichen Schärfungseffekt der Banden brachte die Übernahme eines Vorschlags von Veis und Anesey (1965), die die Banden in einem elektrophoretischen Verfahren mit Amidoschwarz anfärbten. Die Anordnung wurde jedoch modifiziert:

Der polyanionische Farbstoff läuft hierbei den zur Kathode wandernden Proteinen entgegen. Die Banden werden nun zusätzlich dadurch komprimiert, daß ihre Front fixiert wird, sobald der Farbstoff sie erreicht, während der übrige Teil der Bande weiter dem Farbstoff entgegenwandert, bis auch er - angefärbt - zum Stillstand kommt.

Der Vorteil der elektrophoretischen Entfärbung (Weis und Anesey, 1965) konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Es hatte sich nämlich herausgestellt, daß die Bandenintensität besonders im Falle von Abbaupeptiden bei der elektrophoretischen Entfärbung stark abnahm. Eine Erhöhung der aufgetragenen Proteinmenge brachte zwar eine Abhilfe, allerdings auf Kosten der Trennqualität. Auch Umpolung der Apparatur beseitigte den Effekt nicht, so daß "konventionell" entfärbt wurde, d.h. durch Entfernung des Farbstoffes aus den Gelen mittels Diffusion. Sehr lästig erschien der hohe Zeitbedarf für die Entfärbung der mit Amidoschwarz angefärbten Gelzylinder, besonders beim 15 %igen Gel. Eine einfache Vorrichtung ermöglichte die Verwendung beliebig großer Volumina Entfärbungsmittel bei gleichzeitiger Erhöhung der Diffusion durch permanente Umspulung der Gele. Auf diese Weise ließ sich die Entfärbung über Nacht bewerkstelligen. Die Versuchsanordnung sowie die Entfärbung werden im Experimentellen Teil (Versuch 6) beschrieben.

2.4.3. Aminosäureanalytik.

Hier sollen Methodik und Apparate beschrieben werden, die der quantitativen Verfolgung der Abnahme des Methioningehaltes in den Proben der Spaltungskinetiken dienten.

2.4.3.1. Die Totalhydrolyse.

Die Totalhydrolyse der Proben wurde in abgeschmolzenen Kölbchen unter gereinigtem Stickstoff durchgeführt (Noltmann et

al., 1962). Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen und der Verwendung von stets frischer HCl konnte nicht verhindert werden, daß bei der Aminosäureanalyse häufig geringe Mengen Methioninsulfoxid gefunden wurden. Die Schwankungen dieses Wertes traten auch innerhalb völlig gleich behandelter Parallelproben auf und blieben unerklärlich. Um Methionin bei Zimmertemperatur zum S-Oxid zu oxydieren, müssen immerhin Perameisensäure oder H_2O_2 in 1 n HCl eingesetzt werden (Stegemann, 1960; Iselin, 1961). Das Auftreten von Methioninsulfoxid unter Hydrolysebedingungen wird auch von anderen Autoren berichtet (Piez und J. Gross, 1959; J. Gross, 1963).

Alle in der vorliegenden Arbeit angeführten Aminosäurewerte sind auf die Hydrolysezeit null korrigiert (Noltmann et al., 1962). Zu diesem Zweck wurde für das Kollagen eine eigene Hydrolysekinetik aufgenommen. Die Korrekturfaktoren für diejenigen Aminosäuren, deren Werte sich in Abhängigkeit von der Hydrolysedauer ändern, gibt Tabelle 8 wieder.

Tabelle 8: Korrekturfaktoren für eine 24-stündige Hydrolyse von Kollagen für Verluste bei Ser, Thr und Tyr bzw. für eine Zunahme der Werte während der Hydrolyse bei Val, Ile und Leu.

Aminosäure	Ser	Thr	Tyr	Val	Ile	Leu
Korrekturfaktor	1.08	1.04	1.17	1.07	1.08	1.05

Die in dieser Arbeit mittels Aminosäureanalyse verfolgten Spaltungskinetiken erforderten häufig die Bestimmung sehr kleiner Aminosäuremengen, insbesondere des Methionins. Deshalb ist an dieser Stelle unbedingt eine kritische Wertung der Genauigkeit dieser Methode erforderlich.

Bei Aufnahme der erwähnten Hydrolysekinetik war festgestellt

worden, daß sich der Methioninwert in Abhängigkeit von der Hydrolysezeit nicht ändert. Der allen Berechnungen dieser Arbeit zugrunde gelegte Wert für den Methioningehalt von 0.56 Mol% war als Mittelwert aus 32 Kollagenanalysen erhalten worden. Der mittlere Bestimmungsfehler betrug dabei ± 3.2 %, die maximale Abweichung ± 10.7 %. Weiterhin wurde festgestellt, daß sich noch 0.005 u Mol Methionin mit einer Genauigkeit von ± 30 % bestimmen lassen, das entspricht etwa 0.03 ± 0.01 Mol %. Die Werte waren also recht gut reproduzierbar.

2.3.3.2. Analysen mit dem Aminosäureanalysator "Aminomat".

Für die analytische Verfolgung des Spaltungsausmaßes der Methionylbindung in den ersten Versuchsreihen (Ansätze I bis III; vergl. Kap. 2.2.1.) wurde das Gerät "Aminomat" (Fa. Bender und Hobein, München) verwendet (Hannig, 1959). Es arbeitet im Prinzip nach der von Moore und Stein (1954) beschriebenen Methode und registriert das angefärbte Eluat automatisch. Zur Auswertung wurden alle Peaks vollständig gezeichnet. Nicht ausreichend getrennte Peaks wurden konstruiert. Die Flächenwerte der Peaks wurden planimetrisch bestimmt und zur Ermittlung der Absolutmengen der Aminosäuren mit denen aus bekannten Testgemischen verglichen. Besonders kleine Peaks wurden bis zu hundert Malen umfahren. Stets wurden Mittelwerte mehrerer Planimeterbestimmungen errechnet, da es auf die exakte Bestimmung der kleinen Methioninpeaks, die auch im Ausgangskollagen nur 0.56 Mol% ausmachen, besonders ankam.

2.3.3.3. Analysen mit dem Aminosäureanalysator BC 200 ("Biochrom").

Da bisher keine genauen Angaben für die Aminosäurebestimmung an diesem Analysator existieren, sollen hier einige Erfahrungen mitgeteilt werden.

Nach den diesem Gerät (Fa. Bio-Cal Instrument, Gräfelfing bei München) beigefügten Arbeitsvorschriften können nur Proteinhydrolysate analysiert werden, die weder sehr ungleiche Mengen noch seltener vorkommende Aminosäuren enthalten dürfen.
Für das Kollagen war das angegebene Elutionsprogramm ungeeignet. Außerdem war die Analysendauer für ein Gemisch saurer und neutraler Aminosäuren mit etwa 3 Stunden verhältnismäßig lang. Eine Trennzeit von 90 Minuten erwies sich für dieses Gemisch als ausreichend.
Die Verwendung von sogenannten sphärischen Harzen sehr einheitlicher Partikelgröße erlaubt die Anwendung hoher Drucke und Durchflußgeschwindigkeiten. Verwendet wurden die Harze Aminex A 5 für die Basen und Aminex A 6 für diejenige Säule, an der saure und neutrale Aminosäuren aufgetrennt wurden. Die Puffergeschwindigkeit wurde auf 105 ml pro Stunde einreguliert. Die Ninhydrinpumpe förderte etwa 1/3 dieses Wertes.

Die Analyse von Kollagenhydrolysaten ist aus mehreren Gründen schwierig: Einerseits müssen Glycin und Alanin, die zusammen 44 Mol% ausmachen, gut genug getrennt werden. Das wurde durch pH-Senkung des Elutionspuffers von pH 3.25 auf 3.05 erreicht. Zum anderen besteht die Schwierigkeit darin, Hydroxyprolin von Asparaginsäure abzutrennen, ohne gleichzeitig die Trennung der Glutaminsäure von Prolin zu beeinträchtigen. Bedingt durch die jeweiligen pK-Werte der Aminosäuren bzw. ihre Diffusionskonstanten werden Hydroxyprolin und Asparaginsäure bei tiefer Temperatur und ausreichend niedrigem pH, Glutaminsäure und Prolin jedoch nur bei hoher Temperatur und höheren pH-Werten getrennt. Es hat sich aus diesem Grunde als nützlich erwiesen, die Aminosäuren, die zwischen Hydroxyprolin und Prolin eluiert werden, durch einen Temperatur- und pH-Gradienten aufzutrennen. Der Zeitbedarf für die Elution aller sauren und neutralen Aminosäuren des Kollagens nach diesem Programm beträgt 115 Minuten einschließlich Regenerierung und Äquilibrierung der Säule.

Sollen zusätzlich 3-Hydroxyprolin und Methioninsulfoxid von 4-Hydroxyprolin und außerdem Homoserin von der Glutaminsäure abgetrennt werden, so ist eine weitere Senkung des Start-pH-Wertes auf 2.84 notwendig. Dabei muß in Kauf genommen werden, daß sich der Zeitbedarf auf 170 Minuten erhöht.
Die basischen Aminosäuren werden z.Zt. noch von einer zweiten Säule mit einem Puffer vom pH 5.28 eluiert.

Die aufgegebenen Hydrolysatmengen richten sich nach der Peakfläche für die in kleinster Menge vorkommende Aminosäure. Für die Analyse des Restmethionins waren beim Kollagen nach Bromcyanspaltung bei Verwendung der Normalküvette 1-1.5 mg erforderlich, um eine Analyse der sauren und neutralen Aminosäuren durchführen zu können. Im allgemeinen reicht 0.1 uMol einer Aminosäure zu ihrer Bestimmung völlig aus. Verwendet man die neuerdings eingebaute Mikroküvette, so wird die Empfindlichkeit der Methode noch um einen Faktor 5 gesteigert, so daß man mit 0.03 uMol einer Aminosäure auskommt. Die Bedingungen, die sich für die Elution der sauren und neutralen Aminosäuren des Kollagens am geeignesten erwiesen haben, sind im Experimentellen Teil als Versuch 7 zusammengestellt.

Die Analyse eines Kollagenhydrolysates zeigt Abb. 20. Die eingezeichneten Pfeile bezeichnen die Stellen im Chromatogramm, wo sich ein Pufferwechsel auszuwirken beginnt.

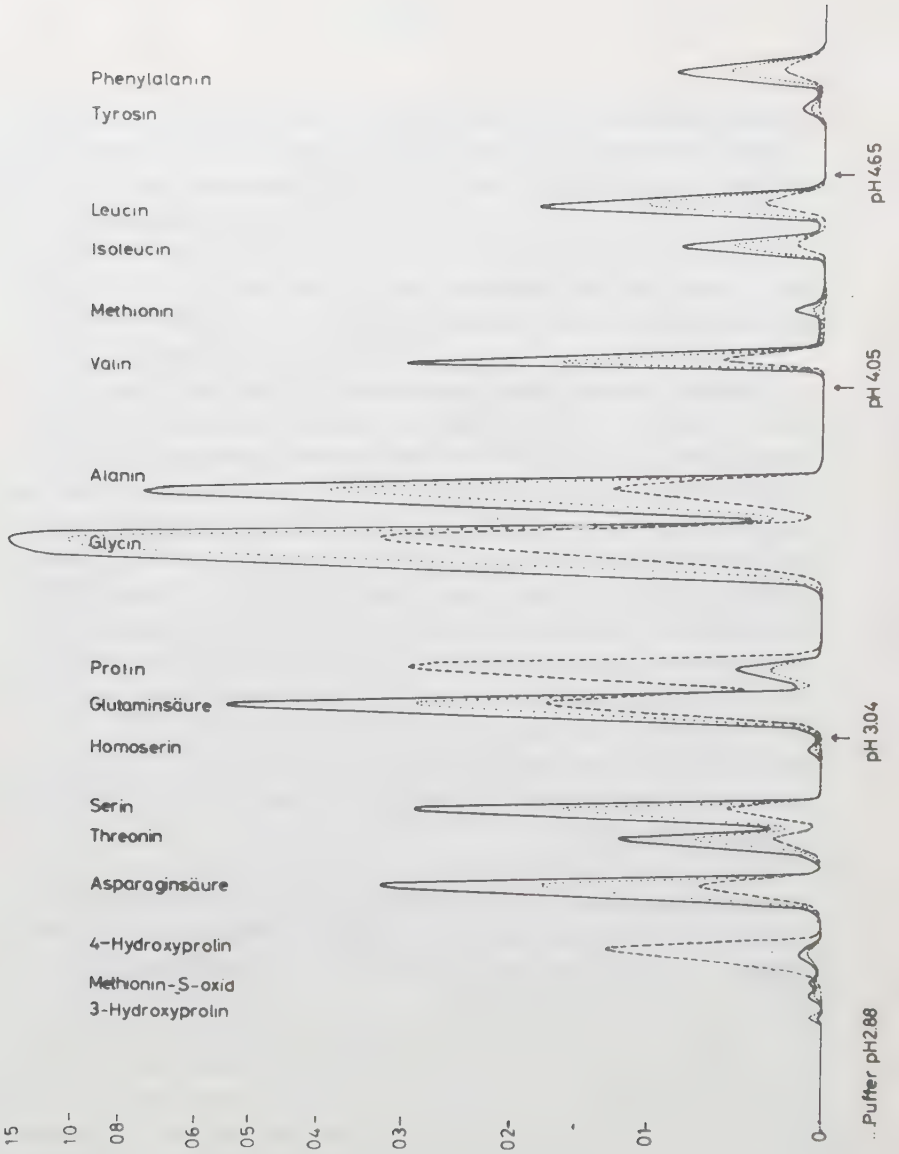


Abb. 20: Analyse eines Kollagenhydrolysates (saure und neutrale Aminosäuren);—— Messung bei 570 mu; ••• Messung einer reduzierten Extinktion bei 570 mu; --- Messung bei 440 mu.

3. Diskussion der Ergebnisse

Die in der vorliegenden Dissertation durchgeführten Versuche zur Spaltung des Kollagens mit Bromcyan standen in engem Zusammenhang mit Arbeiten zur Aufklärung seiner Primärstruktur. CNBr ist ein sehr spezifisch wirkendes Spaltungsreagenz, wobei im Zuge der Reaktion ausschließlich die Bindungen des Methionins gelöst werden. Die Spaltung mit Bromcyan sollte aufgrund des geringen Methioningehaltes die Zerlegung des Kollagenmoleküls in eine überschaubare Anzahl von Bruchstücken ermöglichen.
Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch, daß im Falle des Makromoleküls Kollagen die Spezifität der Reaktion durch einen gleichzeitigen hydrolytischen Abbau gestört wird. Diese unspezifische Spaltung wird durch die hohe H-Ionenkonzentration verursacht, die ihrerseits jedoch die Voraussetzung für den Ablauf der Bromcyanreaktion darstellt.

3.1. Die unspezifische Spaltung.

Dafür, daß tatsächlich eine über die spezifische Spaltung hinausgehende Hydrolyse stattfindet, sprechen besonders folgende Tatsachen:

1. das Zunehmen des Ninhydrintiters auch in den CNBr-freien Kontrollen,
2. das zu 5 100 $\pm$ 200 ermittelte mittlere Molekulargewicht der Abbaupeptide (gegenüber dem berechneten Wert von etwa 15 000),
3. das Ergebnis der C-terminalen Endgruppenbestimmung, wonach das erwartete Homoserin als Umwandlungsprodukt des Methionins bei der CNBr-Reaktion nur etwa 1/3 der carboxylendständig gefundenen Aminosäuren ausmacht und
4. das N-terminale Auftreten säurelabiler Bindungspartner wie z.B. Ser und Asp.

Die unter den Bedingungen der CNBr-Reaktion nicht vermeidbare unspezifische Hydrolyse erklärt ferner den Befund, daß in den anfänglichen Trennversuchen stets sehr viele Fragmente gefunden wurden, die sich nur sehr unvollkommen auftrennen ließen.

Diese Ergebnisse in ihrer Gesamtheit entkräften den Einwand, daß das Ansteigen des Ninhydrintiters allein durch die Desamidierung von Säureamiden bzw. durch die Freisetzung von acylierten α-Aminogruppen der Telopeptide, die seitlich aus dem tripelhelicalen Grundkörper des Kollagens herausragen, verursacht werden könnte. Letztere sind unter den angewendeten Versuchsbedingungen stabil (Hörmann und Joseph, 1965). Auch die Peptidbindungen dieser Telopeptide (Rubin et al., 1965; Deyl et al., 1967 b und c) dürften kaum säurelabiler sein als die des denaturierten Moleküls selbst.

Die unspezifische Spaltung scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im wesentlichen durch zwei verschiedene Reaktionen verursacht zu werden:
einmal durch die Hydrolyse säurelabiler Bindungen und zum anderen durch die oxydative Zerstörung von Hydroxyaminosäuren.

1. Es ist bekannt, daß die Bindungen der Hydroxyaminosäuren (Bergmann et al., 1923, 1924) und der sauren Aminosäuren (vergl. Partridge und Davis, 1950; Witkop, 1961; Hill, 1965) unter der katalytischen Wirkung von H-Ionen durch einen Nachbargruppeneffekt leicht gelöst werden. (Diese Wirkung wurde mehrfach zur spezifischen Spaltung dieser Bindungen eingesetzt: vergl. z.B. Lenard und Hess, 1964; bzw. Sanger, 1949; Allison und Grice, 1962; Schroeder et al., 1963.) Das N-terminale Auftreten dieser Aminosäuren in den Bruchstücken verstärkt den Verdacht, daß ein Teil der in der vorliegenden Arbeit beobachteten "unspezifischen" Spaltung nach einem dieser katalytischen Mechanismen abläuft.

2. Die saure Hydrolyse scheint jedoch nicht ausschließlich für die unspezifische Spaltung der Peptidkette verantwortlich zu sein. In Abhängigkeit von der Spaltungsdauer wird nämlich bei allen Versuchen auch eine Abnahme der Hydroxyaminosäuren festgestellt (Aminosäureanalyse). Dieser Befund kann nur durch die Annahme einer Zerstörung der Hydroxyaminosäuren während der Reaktion selbst gedeutet werden.

Diese Zerstörung der Hydroxyaminosäuren wurde in Abb. 21 a und b in Abhängigkeit von der Spaltungsdauer graphisch dargestellt. Die Zerstörung ist in % des Ausgangswertes angegeben: Threonin scheint in den Versuchen in TFA (Ansätze IV und V) und bei 20°C nach Salzdenaturierung (Ansätze VI - XIV) unter den angewendeten Reaktionsbedingungen stabil zu sein, während bei 30°C eine geringfügige Abnahme festgestellt wurde (vergl. Kap. 2.2.1.). Bei Spaltung in TFA scheint der Grad der Zerstörung etwas von der Temperatur, bei den Versuchen bei pH 1 und 20°C nach Salzdenaturierung geringfügig von der Art des zugefügten Denaturierungsmittels abhängig zu sein. Die geringen Unterschiede lassen sich jedoch nicht quantitativ auswerten. Bei pH 3.3 und 20°C ist die Abnahme der Hydroxyaminosäuren wesentlich geringer und läßt sich ebenfalls nicht graphisch darstellen.

Insgesamt beträgt die Abnahme von Serin und Tyrosin während der Denaturierungs- und Spaltungsdauer bei pH 1 etwa 12, bei pH 3.3 etwa 3 - 4 Mole pro Mol Kollagen. Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß ein hoher Prozentsatz der Gesamthydrolyse von etwa 21 bzw. 5 Molen pro Mol Kollagen auf der oxydativen Zerstörung der Hydroxyaminosäuren beruhen dürfte.

Die Verluste an Serin treten auch in den nicht mit Bromcyan behandelten Kontrollen auf. Sie werden also nicht durch das Bromcyan verursacht. Als Mechanismus für den Verlust an Serin könnte ein oxydativer Abbau in Betracht kommen, der

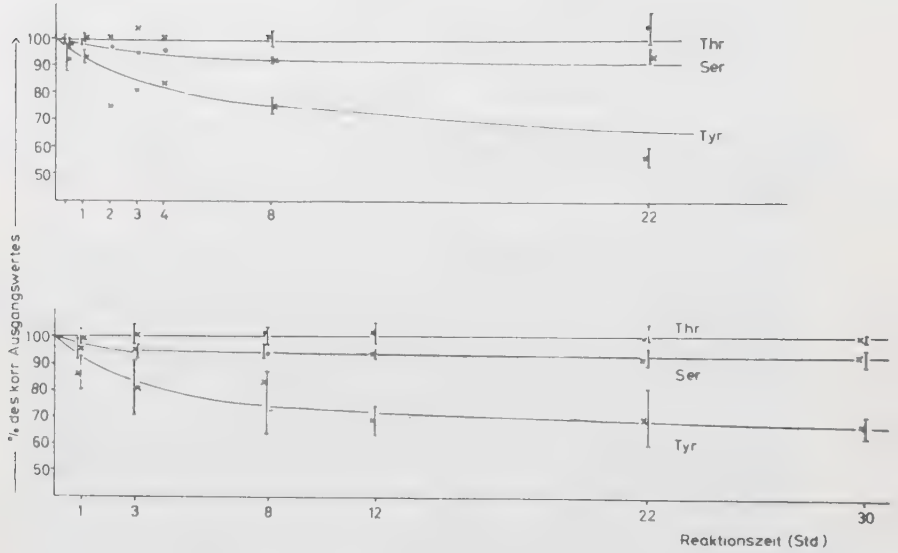


Abb. 21: Kinetik der oxydativen Zerstörung der Hydroxyaminosäuren während der CNBr-Reaktion für Serin, Threonin und Tyrosin.
a in TFA nach Wärmedenaturierung (Ansätze IV und V), b in wässriger HCl bei pH 1 und 20°C in Gegenwart denaturierender Salze (Ansätze VI - IX, XIV und XVI).

wie bei der Zerstörung während der sauren Totalhydrolyse durch die benachbarte Hydroxylgruppe induktiv begünstigt wird. Im Zuge der Reaktion sollte die entstandene Iminogruppe zur α-Keto-ß-hydroxysäure hydrolysiert werden. In der Tat ist bei der Analyse des Totalhydrolysats der Abbaupeptide der Ammoniakgehalt gegenüber unbehandeltem Kollagen geringfügig erhöht.

Die Zerstörung des Tyrosins dagegen ist in den Ansätzen mit Bromcyan wesentlich größer als in den Kontrollen; quantitative Aussagen sind jedoch wegen des geringen Gehaltes des Kollagens an dieser Aminosäure kaum möglich. Für die Zerstörung des Tyrosins ist wohl ein oxydativer Bromierungsmechanismus verantwortlich zu machen, der die Hydrolyse der dabei auftretenden Iminoäthergruppierung ermöglicht (Corey und Haefele, 1959; Shaltiel und Patchornik, 1963). Das als Endprodukt entstehende Tyrosin-spirolacton wird bei der Aminosäureanalyse nicht gefunden. Histidin, das ebenfalls eine reaktionsfähige π-Bindung in γ, δ-Stellung besitzt, wird nicht angegriffen, was wohl auf seiner erheblich geringeren Reaktivität beruht (Funatsu et al., 1964).

Unklar bleibt die Frage nach der Herkunft des Bromierungsmittels für die obige Reaktion. Das Bromcyan wurde frisch destilliert eingesetzt und sollte daher frei von Bromspuren gewesen sein. Trimeres Cyanurbromid, das ebenfalls als Bromierungsmittel in Frage kommen könnte, bildet sich bevorzugt im alkalischen Bereich (Kurihara et al., 1963; Aojama et al., 1965). Zwischen beiden Möglichkeiten kann nicht unterschieden werden, beide können im wässrigen Medium als Reagenz für die oxydative Bromierung nicht ausgeschlossen werden.

3.2. Die Spaltung mit Bromcyan.

Unter den anfänglich für die Bromcyanreaktion verwendeten Spaltungsbedingungen (Nordwig und Dick, 1965; vergl. Kap. 2.1.) war, wie schon oben erwähnt, gleichzeitig neben der spezifischen Spaltung der Peptidkette am Methioninrest ein beträchtlicher hydrolytischer Abbau erhalten worden. Es gibt nun zwei Parameter, die das Ausmaß dieser unspezifischen Hydrolyse beeinflussen und von deren Variation man sich eine Herabsetzung der unspezifischen Spaltung erhoffen konnte:

1. Eine Erhöhung des pH-Wertes: Sie verlangsamt jedoch, wie gezeigt werden konnte, auch die Geschwindigkeit der

spezifischen Spaltung so stark, daß dadurch längere Reaktionszeiten erforderlich werden, die wiederum die unspezifische Hydrolyse begünstigen.

2. Eine Senkung der Temperatur: Die quantitative Spaltung des Kollagens ist nur im denaturierten Zustand möglich. Bei tieferen Temperaturen muß deswegen eine Renaturierung des Kollagens durch Zusatz denaturierender Agenzien ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des Kapitels 2.2.3. und die graphische Darstellung von c_m als Maß für die molare Denaturierungswirksamkeit in Abhängigkeit von der Halbwertszeit der CNBr-Reaktion (s. Abb. 24) scheinen nun darauf hin zu deuten, daß diese Salze die spezifische Reaktion am Methionin ebenfalls verlangsamen, so daß auch in diesem Falle verlängerte Reaktionszeiten die unspezifische Hydrolyse begünstigen.

Die Veränderung beider Parameter, pH-Erhöhung und Temperatursenkung, beeinflußt also die spezifische Bromcyanreaktion auch im ungünstigen Sinne. Die besten Ergebnisse aller unternommenen Versuchsreihen wurden bei der Spaltung von wärmedenaturiertem Kollagen bei Raumtemperatur erzielt. In diesem Musterversuch (Ansatz XVI) wurde nur soviel Salz zugefügt, daß einerseits die Renaturierung erheblich erschwert war, andererseits aber doch die spezifische Reaktion in möglichst kurzer Zeit ablaufen konnte. Da in Kap. 2.2.3. festgestellt worden war, daß auch während der Salzdenaturierung bereits hydrolytischer Abbau einsetzt, wurde in diesem Falle wärmedenaturiert, anschließend der pH gesenkt und erst dann das die Renaturierung verhindernde Salz zugegeben. Diese Bedingungen scheinen nach den Ergebnissen dieser Arbeit am geeignetsten für das Ziel zu sein, bei quantitativem Ablauf der spezifischen Reaktion ein möglichst geringes Ausmaß an unspezifischer Nebenreaktion zuzulassen. Auch die Auftrennung der Abbaupeptide des Gesamtkollagens aus solchen Ansätzen erscheint denkbar.

Im Arbeitskreis von Piez ist die Isolierung von Abbaupep-

tiden des Kollagens inzwischen auf einem anderen Wege gelungen (Butler et al., 1967; Bornstein, 1967 a und b). Die Autoren hatten die α-Untereinheiten des Kollagens getrennt und sodann isolierte α_1-Ketten in die Spaltungsreaktion eingesetzt. In diesen Veröffentlichungen berichten sie nicht von einer unspezifischen Hydrolyse; einer privaten Mitteilung zufolge (Piez, Tokio 1967) fanden die Autoren in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit jedoch ebenfalls eine hydrolytische Spaltung, die allerdings noch nicht quantitativ bestimmt wurde.
Aus diesem Grunde ist auch ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Befunden von Piez noch nicht möglich. Vieles deutet jedoch darauf hin, daß es unvorteilhaft ist, das gesamte Kollagenmolekül in die Spaltungsreaktion einzusetzen. Das nicht vorgetrennte Kollagen enthält nämlich auch noch die α_2-Ketten, die ganz wesentlich labiler und auch hydrolyseempfindlicher sind als die α_1-Einheiten (Kühn und Tkocz, unveröffentlicht) und wahrscheinlich für das hohe Ausmaß der Hydrolyse bei der Spaltung des vollständigen Kollagenmoleküls verantwortlich sind.

3.2.1. Der pH-Effekt* (Beschleunigung der CNBr-Reaktion durch Wasserstoffionen).

Im Verlaufe der vorliegenden Arbeit war eine Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von Methionylpeptidbindungen von der H-Ionenkonzentration festgestellt worden, für die

---

* Sehr herzlich danke ich Herrn Univ. Doz. Dr. J. Sauer, Org. Chem. Institut der Universität München, für die Diskussion der Ursachen des pH-Effektes und Herrn Priv. Doz. Dr. H. Hörmann, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, für die Durchsicht dieses Kapitels.

der von E. Gross und Witkop (1961) aufgestellte Mechanismus (s. Abb. 23) keine befriedigende Erklärung bietet.

Wie die Versuche bei pH 3.3 und besonders der Versuch der 72-stündigen Spaltung bei pH 3.6 zeigen, wird bei höheren pH-Werten keine vollständige Spaltung erreicht. Man muß annehmen, daß die Reaktion zum Stillstand kommt, ehe alle Methioninreste mit CNBr umgesetzt wurden. Es werden nämlich bei der Aminosäureanalyse noch 20 bis 30 % des ursprünglichen Methionins wiedergefunden.

Im folgenden soll zunächst untersucht werden, ob die bei höheren pH-Werten begünstigte Rückbildung der nativen Konformation des Kollagens für den nicht-quantitativen Verlauf der Reaktion bei höherem pH verantwortlich zu machen ist. Eine Denaturierung des Kollagens ist nämlich erforderlich, um die Spaltungsreaktion ablaufen zu lassen (Nordwig und Dick, 1965), da die starre, tripelhelicale Struktur des Moleküls den zweiten Reaktionsschritt, nämlich den Ringschluß zum Lacton oder die Ausbildung einer CN-Doppelbildung (s. Abb. 23), aus sterischen Gründen nicht zuläßt.

Es wurde daher geprüft, ob in Versuchen, die zu keiner quantitativen Spaltung führen (z.B. Ansatz III: Spaltung bei pH 2.5 und 32°C nach Wärmedenaturierung; vergl. Kap. 2.2.1.) eine Renaturierung für den unvollständigen Verlauf der Reaktion verantwortlich gemacht werden kann. Abb. 22 zeigt, daß dies nicht der Fall ist. Vielmehr reichen die gewählten Versuchsbedingungen des Ansatzes III aus (pH 2.5, 32°C; natürlich in diesem Falle ohne Zusatz von CNBr), um eine nennenswerte Rückbildung der nichtspaltbaren, nativen Konformation des Kollagens zu verhindern: Nach Denaturierung und Erreichen des für denaturiertes Kollagen charakteristischen Wertes von -360° stieg in diesem Kontrollversuch die spezifische optische Drehung nämlich während 48 Stunden nur um 4 % an. Andererseits tritt die pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit und der Spaltungsausbeute auch dann in gleichem Maße

auf, wenn Salze die vollständige Denaturierung während der Spaltung aufrecht erhalten (vergl. z.B. Abb. 12 und Abb. 13). Es ist somit ersichtlich, daß der geschilderte pH-Effekt nicht durch die pH-Abhängigkeit der De- bzw. Renaturierungstemperatur erklärt werden kann.

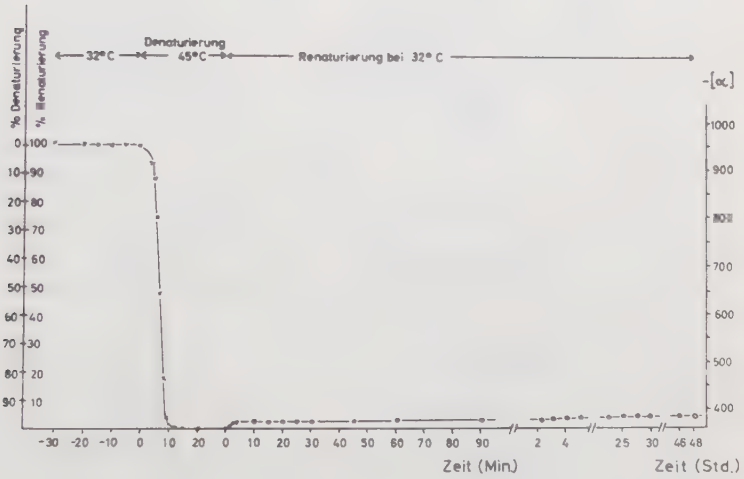


Abb. 22: Renaturierungsversuch unter Spaltungsbedingungen bei pH 2.5 und 32°C. (Das Kollagen wurde bei 45°C denaturiert. Der Abfall der spezifischen optischen Drehung ist ein Maß für den Denaturierungsgrad.)

Die Erklärung für die pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit muß also im Reaktionsmechanismus (1.) oder in den Wechselwirkungen der reagierenden Gruppe mit dem Protein (2.) gesucht werden.

1. Zunächst soll nun untersucht werden, ob eine Möglichkeit besteht, den Mechanismus durch Wasserstoffionen zu beein-

flussen.

Abb. 23 zeigt den für Modellpeptide aufgestellten Mechanismus der CNBr-Reaktion (nach E. Gross, 1967).

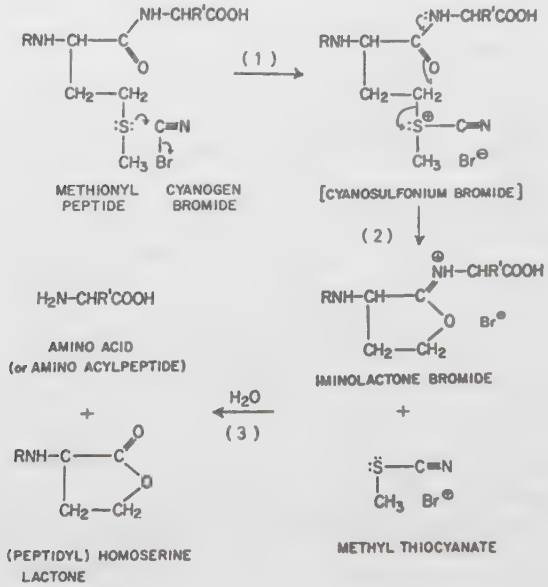


Abb. 23: Der Mechanismus der CNBr-Reaktion, entnommen aus E. Gross (1967).

Für Methionin und methioninhaltige Modellpeptide ist vermutlich eine gewisse pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (nicht der Spaltungsausbeute!) gegeben, insbesondere, wenn die carboxylseitig benachbarte Aminosäure eine freie Carboxylgruppe trägt. Der Ladungszustand einer dem Reaktionsort benachbarten freien Carboxylgruppe dürfte die Nucleophilität des Carbonyl-Sauerstoffes des Methionins induktiv beeinflussen. Witkop (1961) fand jedoch, daß Methionin und Methionylpeptide auch bei neutralem pH noch

gespalten werden können (solange nicht vorhandene Ammoniumgruppen entladen und reaktionsfähig werden). Dieser Befund scheint darauf hinzudeuten, daß sich Modellpeptide und Proteine in Bezug auf die Abhängigkeit der Spaltungsausbeute vom pH-Wert unterschiedlich verhalten können.

Um eine mögliche pH-Abhängigkeit, die im Mechanismus der Reaktion vorhanden sein könnte, von einem pH-abhängigen Einfluß polarer Gruppierungen des Proteins abzugrenzen, soll zunächst der Mechanismus der CNBr-Reaktion etwas eingehender erläutert und auf eine mögliche Beeinflußbarkeit durch H-Ionen untersucht werden:
Methionin reagiert schon unter sehr schonenden Bedingungen mit dem Bromcyan unter Anlagerung (1). Gegenüber den einfachen Thioäthern verläuft der folgende Verdrängungsschritt (2) besonders rasch, weil durch einen Nachbargruppeneffekt das Auftreten eines energiereichen Carboniumions vermieden wird (vergl. Hine, 1962): der benachbarte Carbonylsauerstoff ermöglicht durch nucleophilen Ringschluß mit dem γ-C-Atom den Austritt der Sulfoniumgruppe als Methylrhodanid. Die positive Ladung wird dabei zum Peptidstickstoff verschoben, wo sie wesentlich stärker resonanzstabilisiert ist als am Schwefel, dem zur Mesomerie nur die ohnehin elektonenziehende CN-Gruppe zur Verfügung steht. Die entstandene Iminoäthergruppierung ist hydrolysabel, wobei die Peptidkette gespalten wird (3).

Der pH-Effekt kann nur in einem Reaktionsschritt wirksam sein, der vor dem ersten irreversiblen liegt, da bei höheren pH-Werten, wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, noch nichtumgesetztes Methionin isoliert werden kann. Es ist daher notwendig, den Mechanismus auf irreversible Schritte zu untersuchen.

Die Reaktion enthält zwei irreversible Stufen:
a. Der letzte Teilschritt, die Hydrolyse des Iminolactonpeptids (3), ist irreversibel (die umgekehrte Reaktion,

die Bildung von Iminoäthern aus Lactonen und Aminen, ist nicht möglich). Die Deprotonierung der Immoniumgruppierung bei einem genügend hohen pH, die eine Hydrolyse der Peptidbindung hemmen könnte, kann jedoch nur dann für die Verlangsamung der Gesamtreaktion ursächlich sein, wenn die Voraussetzungen zutreffen, daß dieser Schritt der langsamste ist und die vorhergehenden Teilreaktionen (1 und 2) reversibel sind.
Die Bestimmung der Reaktionskonstanten läßt zwar keinen Schluß darauf zu, welches der langsamste Reaktionsschritt ist, da alle drei Teilreaktionen nach der 1. Reaktionsordnung ablaufen (die Anlagerung (1) nach S_E2 (pseudomonomolekular), der Ringschluß (2) nach einem intramolekularen S_N2-Mechanismus und die Hydrolyse (3) nach S_N2 (pseudomonomolekular)). Aber eine Abschätzung der einzelnen Aktivierungsenergien macht wahrscheinlich, daß Reaktionsschritt (1) der langsamste ist: Einerseits ist für die Umhybridisierung des Schwefels* bei der Anlagerungsreaktion (1) eine beträchtliche Aktivierungsenergie erforderlich. Andererseits läuft die Folgereaktion (2) schnell ab: (Hine, 1962) die positive Ladung ist in der Immoniumform stärker resonanzstabilisiert als in der Sulfoniumform, der Austritt des Methylthiocyanats stabilisiert also das primäre Anlagerungsprodukt. Man kann aus diesen Überlegungen schließen, daß die S-Cyanierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Auch der von Witkop (1961) mitgeteilte Befund, daß keine Zwischenstufen der Reaktion isoliert werden können, macht wahrscheinlich, daß der Anlagerungsschritt (1) der langsamste ist.

b. Auch der zweite Reaktionsschritt des synchron verlaufenden, intramolekularen Ringschlusses ist irreversibel. (Die

---

* Thioäther bilden nahezu reine p-Bindungen aus (Yukawa, 1965), Sulfoniumverbindungen besitzen jedoch sp^3-Orbitale.

umgekehrte Reaktion der Bildung von Sulfoniumsalzen aus Rhodaniden und Lactonen ist nicht möglich). Es folgt, daß die Hydrolysereaktion (3) nicht für den pH-Effekt verantwortlich sein kann. Wollte man die Ursache für den pH-Effekt in der Ringschlußreaktion (2) suchen, so muß man die Protonierung der Peptidbindung bei tiefem pH als beschleunigende Wirkung ausscheiden: Einerseits ist die Basizität der Peptidbindung außerordentlich gering (pK -6.0), zum anderen müßte die positive Ladung am Stickstoff - dem tatsächlichen Befund entgegengesetzt - zu einer erheblichen Verlangsamung der Ringschlußreaktion führen, da der Elektronenabzug vom Carbonylsauerstoff die für den Ringschluß erforderliche nucleophile Reaktivität der Gruppe herabsetzt.
Man könnte weiterhin annehmen, daß für den Protoneneffekt die Stabilisierung des Cyansulfoniumions durch eine Ylen $\rightleftharpoons$ Ylid - Mesomerie verantwortlich ist. Hierbei müßte ein Proton des benachbarten γ-C-Atoms abdissoziieren; das Ylid mit einer negativen Partialladung am Kohlenstoff wäre dann gegen den nucleophilen Angriff des benachbarten Carbonylsauerstoffs stabil. Es scheint jedoch sehr zweifelhaft, daß der Elektronenzug der Sulfoniumgruppierung ausreicht, die H-Atome des γ-C-Atoms genügend stark zu acidifizieren, um bei etwa pH 3.6 einen so starken Effekt wie den beobachteten hervorzurufen. (Den pK_a-Wert der fraglichen, protonierbaren Gruppe kann man nach den Ergebnissen der Tabelle 4, Ansatz XV, zu $\gtrsim$ 3.6 abschätzen.)

c. Eine Frage ist nun, inwieweit der erste Schritt der S-Cyanierung reversibel ist. Die Gleichgewichtslage dieses Schrittes kann zwar nicht genau abgeschätzt werden: Aus der Tatsache, daß die Basizität der Elektronenpaare des Schwefels erheblich größer ist als die des Bromidions kann man jedoch folgern, daß die Tendenz zur Rückreaktion gering sein und das Gleichgewicht des Schrittes mehr auf der Seite der Sulfoniumverbindung liegen dürfte, zumal das Bromcyan in großem Überschuß zugesetzt wird. Wahrscheinlich wird das Gleichgewicht durch die sehr schnell ablaufende Folgereaktion

völlig nach rechts verschoben.

Diese Überlegungen machen wahrscheinlich, daß die in dieser Arbeit festgestellte reaktionsbeschleunigende Wirkung von H-Ionen nicht im Mechanismus der Reaktion an sich begründet liegt. Die Befunde deuten darauf hin, daß der pH-Effekt auf der Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch pH-abhängige Ladungswechselwirkungen des umgebenden Proteins beruhen dürfte. Wegen der Irreversibilität der übrigen Stufen ist anzunehmen, daß er nur im ersten, unter c. diskutierten Reaktionsschritt wirksam werden kann.

2. Wenn man die Proteinkomponente in die Suche nach den Ursachen für den pH-Effekt einbezieht, so ist zusätzlich zu berücksichtigen, daß pH-abhängige Ladungswechselwirkungen die Verlangsamung der CNBr-Reaktion bewirken könnten.
Der Reaktionsschritt (1) ist mit einer Ladungsänderung verbunden. Eine Ionenpaarbildung zwischen der Sulfoniumgruppierung und einer dem Reaktionsort benachbarten Carboxylatgruppe bei genügend hohem pH scheint jedoch als Ursache für die Verlangsamung der Spaltungsreaktion bei Erhöhung des pH-Wertes wenig wahrscheinlich zu sein. Zwar könnte eine derartige Wechselwirkung die Sulfoniumverbindung stabilisieren und das Reaktionsgleichgewicht des zweiten Schrittes zugunsten dieser Stufe verschieben. Es ist aber wenig wahrscheinlich, daß sich beim denaturierten Protein eine Ionenbeziehung überhaupt ausbildet, da die Cyansulfoniumverbindung intramolekular weiterreagieren kann, ehe eine Carboxylatgruppe genügend nahe herankommt. Es scheint auch zweifelhaft, ob ein derartiger Komplex bei der Gefriertrocknung oder bei der Totalhydrolyse zu Methionin und CNBr zurückreagiert, da die Thiocyanatgruppe stets mit dem Rest gemeinsam austritt, der den stärksten negativen Induktiven Effekt ausübt (Hine, 1962). Diese Tatsache spricht dafür, daß bei den Methioninresten, die nach der Umsetzung bei höherem pH noch durch die Aminosäureanalyse nachgewiesen werden können, der Anlagerungsschritt (1) gar nicht stattgefunden hat.

Die wahrscheinliche Ursache für den pH-Effekt scheint in einer Abschirmung der Thioäthergruppe durch das umgebende Protein zu liegen. Allerdings fällt es schwer, sich irgendeine direkte Abschirmung des Reaktionszentrums vorzustellen: Die freien Elektronenpaare des Schwefels sind aufgrund der höheren Hauptquantenzahl des Zentralatoms diffuser als die des Sauerstoffs, so daß ihre Polarisierung durch eine saure Gruppe des Proteins, die den elektrophilen Angriff des Bromcyans erschweren würde, unwahrscheinlich erscheint.

Man muß den Zustand der Thioäthergruppen bei höherem pH daher als "buried" bezeichnen und die Ursache für den Effekt in den stereochemischen Gegebenheiten des denaturierten Proteins suchen. Der Befund dieser Arbeit, daß der pK_a-Wert der die Reaktion beeinflussenden, protonierbaren Gruppe bei $\gtrsim$ 3.6 liegt, läßt die Beteiligung freier Carboxylatgruppen an diesem Effekt möglich erscheinen. Man kann sich also vorstellen, daß Ionenpaarbindung zwischen Carboxylat- und Ammoniumgruppen einige Methionylreste im Innern des Proteinknäuels fixieren und dem Angriff des Reagenz entziehen. Die bei niedrigem pH positiv geladene Form des Proteins reagiert nach dieser Vorstellung deshalb schneller, weil die statistische Knäuelkonformation die Reaktion aller Methionylreste mit dem CNBr zuläßt. In der zwitterionischen Konformation hingegen könnte die freie Beweglichkeit der Aminosäurereste durch Ausbildung mehr oder weniger spezifischer Strukturen niedriger Freier Energie eingeschränkt sein, wobei einige Thioäthergruppen abgeschirmt werden.

Es wurde auch bereits von anderen Arbeitskreisen beobachtet, daß Aminosäuren in der Proteinstruktur verborgen und dem Angriff eines Spaltungsreagenz entzogen sein können. Previero et al. (1967 a) fanden z.B., daß beim Lysozym aus Hühnereiweiß nur zwei der sechs Tryptophanreste sich mit Perameisensäure spalten ließen. Schroeder et al. (in Vorbereitung) fanden unter allen angewendeten Reaktionsbedingungen (auch nach Denaturierung) einen der zehn Methioninreste je Unter-

einheit der Katalase mit Bromcyan unspaltbar.

Diese Ergebnisse und die voranstehenden Überlegungen machen wahrscheinlich, daß die Ursache für einen langsameren Ablauf der CNBr-Reaktion bei pH-Erhöhung in einer Beteiligung geladener Seitenketten des denaturierten Proteins zu suchen ist. Allerdings kann aufgrund der experimentellen Daten dieser Arbeit und der Befunde anderer Autoren noch nicht endgültig zwischen den zwei Möglichkeiten der Ionenbeziehungen zwischen Carboxylat- und Sulfoniumgruppen bzw. zwischen Carboxylat- und Ammoniumgruppen unterschieden werden.

Zur restlosen Klärung dieser Frage bedarf es noch zusätzlicher systematischer Untersuchungen an Modellpeptiden und niedermolekularen Proteinen.

3.2.2. Der Salzeffekt (Verlangsamung der CNBr-Reaktion durch denaturierende Agenzien).

Im folgenden soll die Beeinflussung der Geschwindigkeit der CNBr-Reaktion durch die bei 20°C zur Denaturierung notwendigen Agenzien - also Salze und Harnstoff - näher diskutiert werden.
Wie die vorliegende Arbeit gezeigt hat, verläuft die Spaltungsreaktion mit CNBr umso langsamer, je geringer die molare Wirksamkeit der zur Denaturierung bei 20°C erforderlichen Agenzien ist. Die Reaktionskonstanten nehmen also in der Reihe $CaCl_2 > LiBr > GuCl >$ Harnstoff ab (vergl. Kap. 2.2.3.). Als Maß für die Denaturierungswirksamkeit kann der c_m-Wert gelten. Trägt man die einzelnen c_m-Werte gegen die der Reaktionsgeschwindigkeit umgekehrt proportionale Größe $t_{1/2}$ logarithmisch auf ($t_{1/2}$ = Halbwertszeit), so erhält man eine Gerade (vergl. Abb. 24).

Die aus Abb. 24 extrapolierten Abszissenabschnitte (c_m = o) ergeben die Halbwertszeiten für ein salzfreies Medium. Sie betragen für pH 1: $t_{1/2}$ = 0.7 bzw. für pH 3.3: $t_{1/2}$ = 1.6 Stunden und stellen durchaus vernünftige Werte dar;

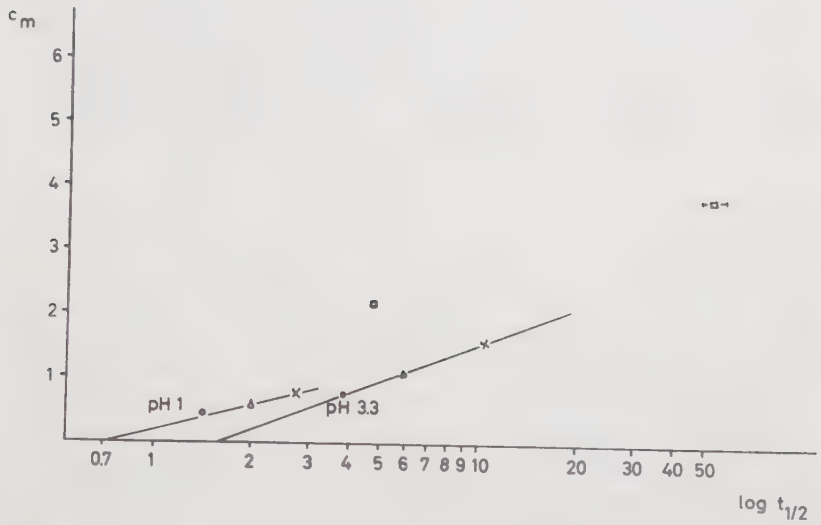


Abb. 24: CNBr-Spaltung von salzdenaturiertem Kollagen: Abhängigkeit der Spaltungsreaktion von den c_m-Werten in halblogarithmischer Darstellung (c_m = die zu 50 %iger Phasenumwandlung notwendige Salzkonzentration).

zum Vergleich: für Ansatz I (pH 1 und 30°C) kann man aus Abb. 8 eine Halbwertszeit von 0.4 Stunden abschätzen. Aus der Neigung der Geraden der Abb. 25 kann man schließen, daß die Gegenwart denaturierender Agenzien die CNBr-Reaktion verlangsamt. Die größte Spaltungsgeschwindigkeit läßt sich nämlich für ein salzfreies Medium extrapolieren. In Gegenwart von Harnstoff verläuft die Reaktion etwa doppelt so schnell als seiner Konzentration entspricht (vergl. auch Kap. 3.3.).

Die gefundene Linearität zwischen log $t_{1/2}$ und c_m läßt

vermuten, daß diese hemmende Wirkung der Denaturierungsmittel eine Eigenschaft der Salze selbst, nicht ihrer Konzentration ist. Trifft diese Annahme zu, so muß auch zwischen den Halbwertszeiten und den pH-Abhängigkeitskonstanten K', die früher definiert (Gleichung (6)) und bestimmt (Tabelle 6) worden waren, eine Proportionalität erkennbar sein. Daß dies tatsächlich der Fall ist, zeigt Abb. 25.

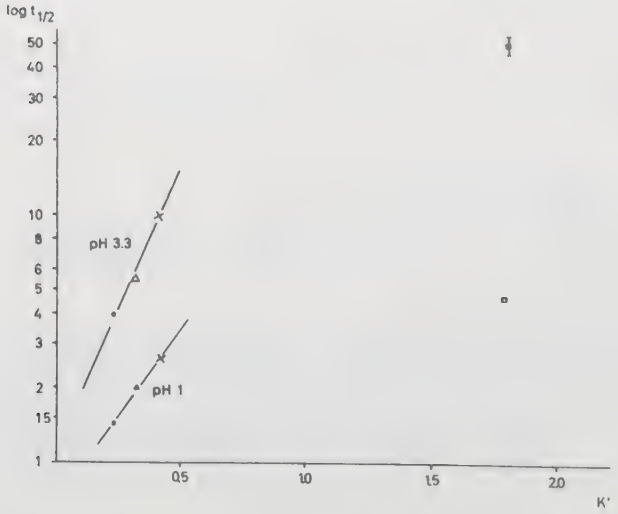


Abb. 25: CNBr-Spaltung von salzdenaturiertem Kollagen: Halblogarithmische Darstellung für die Proportionalität zwischen $t_{1/2}$ und den pH-Abhängigkeitskonstanten K' (vergl. Tabelle 6). o $CaCl_2$, △ LiBr, × GuCl und □ Ha.

Der Harnstoff fällt aus dieser Darstellung heraus, weil sein K'-Wert aus dem Rahmen fällt.

Im folgenden soll eine Interpretation der Hemmwirkung der Salze versucht werden: Offensichtlich wird die Seitenkette

des Methionins oder seine Peptidbindung durch Wechselwirkung mit dem Denaturierungsagens abgeschirmt und dem Angriff des Bromcyans unzugänglicher. Man kann sich eine Wechselwirkung der genannten Agenzien mit den Methionyl-Peptidbindungen des denaturierten Proteins vorstellen. Hierdurch wird die Elektronendichte am Carbonylsauerstoff in der Reihe $CaCl_2 < LiBr < GuCl < Ha$ zunehmend so polarisiert, daß sie dem nucleophilen Angriff auf das γ-C-Atom in abgeschwächtem Maße zur Verfügung steht.

3.3. Die Salzdenaturierung.*

Die spezifische optische Drehung ist ein Maß für den Gehalt eines Proteins an Schraubenstrukturen und damit für den nativen Charakter des Moleküls. Jede Änderung der Tertiärstruktur, bei der Aminosäuren aus ihrer Lage niedrigster potentieller Energie unter Aufweitung der Helix herausgedreht werden - sei es nun aufgrund Brown'scher Molekularbewegung oder sei es durch die Wechselwirkung mit Denaturierungsagenzien oder H-Ionen - äußert sich in einer Verringerung der optischen Drehung. Der Denaturierungsvorgang läßt sich daher besonders einfach durch die Messung dieses Wertes verfolgen. Überschreitet die Summe der Einzelwirkungen von Temperaturbewegung, H-Ionenkonzentration und Denaturierungsagenzien einen bestimmten Schwellenwert, so bricht die Tertiärstruktur des Moleküls zusammen und man erhält die sigmoiden Umwandlungskurven, wie sie z.B. in Abb. [illegible] dargestellt sind. Die Schärfe des Phasenüberganges ist ein [illegible] für die Kooperativität der Umwandlung.

---

* Sehr herzlich danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. J. Engel, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, für die Diskussion der mit der Salzdenaturierung befaßten Kapitel.

Der Einfluß der Temperaturbewegung auf die Denaturierung wurde bei den in Kap. 2.3. beschriebenen Untersuchungen konstant gehalten und die Parameter pH-Wert und Denaturierungsmittelkonzentration für verschiedene Salze variiert. Es wurden Gleichgewichtskurven aufgenommen und die Denaturierung unter Berücksichtigung der "Verdünnung" der Proteinlösung durch die Salzvolumina gemessen. Der Verlauf der Denaturierungskurven bei bestimmtem pH und konstanter Temperatur ist völlig analog der Wärmedenaturierung bei konstanten pH- und Salzkonzentrationsbedingungen (vergl. Abb. 15 und Abb. 17). Die in der vorliegenden Arbeit definierte Denaturierungskonzentration c_m (Gleichung (6)) ist also eine der Denaturierungstemperatur T_m entsprechende Größe.

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Denaturierungskonzentration c_m und dem pH für Guanidiniumrhodanid und Harnstoff als den extremen Fällen der untersuchten Denaturierungsagenzien verfolgt.
Zwischen den gemessenen c_m-Werten und der Wasserstoffionenkonzentration scheint für alle ionischen Denaturierungsmittel - wie Abb. 18 zeigt - ein linearer Zusammenhang zu bestehen. Für den Harnstoff wird jedoch eine Kurve gemessen, die mit steigenden pH-Werten flacher wird und die zwischen pH 3 und pH 6 deutlich vom sonst gleichmäßigen Verlauf abweicht. Hieraus läßt sich schließen, daß der Ladungszustand des Proteinmoleküls in diesem Falle einen Einfluß auf die Harnstoffdenaturierung besitzt, während alle Denaturierungen mit Salzen aufgrund der gefundenen linearen Abhängigkeit anscheinend hiervon unabhängig sind.

Für die Denaturierung durch H-Ionen muß man sicherlich - ähnlich wie man es beim Harnstoff diskutieren könnte - die Überlagerung zweier Effekte annehmen: den (vom pK_a-Wert der sauren Seitenketten des Proteins abhängigen) Effekt der Beeinflussung der Stabilität des Moleküls durch Ladungswechselwirkungen und eine den Salzen analoge Denaturierungswirkung.

Wie Abb. 18 zeigt, scheint im salzfreien Medium die Phasenumwandlung bei einer bestimmten Temperatur durch Erhöhung der H-Ionenkonzentration (auf 5 Mole/l bei 20°C, vergl. Abb. 18) herbeigeführt werden zu können. Man muß deshalb annehmen, daß der destabilisierende Effekt der H-Ionen neben der Einflußnahme auf die Festigkeit der Tripelhelix über Coulomb'sche Wechselwirkungen also auch einen Term für eine den Salzionen analoge Wirkung enthält*.

Die von Dick und Nordwig (1966) ermittelte pH-Abhängigkeitskurve der Schmelztemperatur stellt wohl die Summenkurve beider Effekte dar: also der linearen Abhängigkeit der Denaturierungstemperatur von der Salzwirkung (Hippel und Wong, 1963 a) und der im Bereich der pK_a-Werte der sauren Seitenketten sigmoiden Titrationskurve, die dem steilen Abfall der Schmelztemperatur in diesem engen Bereich zugrunde liegt.

Die voranstehenden Ausführungen haben gezeigt, daß die Salzdenaturierung ein sehr komplexer Vorgang ist. Um ihn zu verstehen, bedarf es jedenfalls noch eingehenderer und systematischerer Untersuchungen als sie im Rahmen der Kapitel 2.2.3. und 2.3. dieser Arbeit (mit dem Ziel der Spaltung des Kollagens bei niedriger Temperatur) möglich waren. Deshalb sollen die nachfolgend mitgeteilten Überlegungen auch nur eine Deutungsmöglichkeit der in dieser Arbeit ermittelten Befunde der Salzdenaturierung darstellen und als Diskussionsbeitrag verstanden werden, der vielleicht den komplizierten Mechanismus der Salzdenaturierung einer Klärung näher bringen könnte.

Wie Bello et al. (1956, 1962) und Mc Bride und Harrington

---

* Hippel und Wong (1963 a) hatten zum Beispiel gefunden, daß die tripelhelicale Struktur des Kollagens in H_2O weniger stabil ist als in D_2O, daß also H_2O die Denaturierungstemperatur geringfügig herabsetzt und somit destabilisierend wirkt.

(1967) gefunden haben, ist die Salzdenaturierung - wie auch die Hitzedenaturierung - über sehr weite Bereiche unabhängig von der Proteinkonzentration. Das kann aber nur bedeuten, daß bei der Salzdenaturierung keine direkte Wechselwirkung zwischen dem Protein und einem Agens in Form einer definierten Bindung existieren kann.* Jeder Mechanismus, der die Salzdenaturierung erklären will, muß diese Tatsache berücksichtigen.

Dem entspricht, daß in der vorliegenden Arbeit eine lineare Abhängigkeit der Denaturierungskonzentration c_m vom pH für alle untersuchten denaturierenden Salze festgestellt wurde. Sie zeigt, daß der Ladungszustand der polaren Gruppen keinen Einfluß auf c_m ausübt, daß diese also an der Denaturierung durch ionische Agenzien nicht beteiligt sein können.

Da überdies auch jede andere direkte Bindung der Salze an das Kollagen - namentlich an die Peptidbindung - eine Abhängigkeit der Denaturierung von der Kollagenkonzentration mit sich bringen würde, muß die Vorstellung, daß Salze über eine Sprengung der Wasserstoffbrücken der Peptidbindung wirken, fragwürdig erscheinen.
Es ist überdies unwahrscheinlich, daß z.B. die Wechselwirkung eines polarisierenden Kations mit der Elektronendichte am Carbonylsauerstoff einen energetisch günstigen Zustand herbeiführt: Einerseits geht die Resonanzenergie der Peptidbindung verloren; sie ist mit 21 kcal/Mol Peptidbindungen recht beträchtlich (Pauling, 1960). Zum anderen wird auch noch die Wasserstoffbrückenbindung gesprengt, was

---

* Bello et al. (1956, 1962) schließen insbesondere - aufgrund von Denaturierungsversuchen an Kollagenen mit blokkierten, polaren Seitenketten - eine Ionenbindung zwischen den Salzionen und den Carboxylat- und Ammoniumgruppen des Proteins als Ursache für die Wirkung der Denaturierungsagenzien aus.

eine weitere Energieabnahme um etwa 2 kcal/Mol bedeutet. Da der Entropiegewinn unabhängig vom Mechanismus der Denaturierung ist, erscheint es mir zweifelhaft, daß dieser Verlust an Enthalpie durch die sehr schwache Bindung eines Kations an den Carbonylsauerstoff bei der Denaturierung ausgeglichen werden könnte.

Man wird daher die denaturierende Wirkung der Salze in einem anderen Mechanismus suchen müssen. In Wirklichkeit reichen nämlich bereits außerordentlich geringe Kräfteänderungen aus, um den Übergang des Kollagens vom nativen in den denaturierten Zustand zu bewirken (Zimm und Bragg, 1958, 1959 a; Zimm, 1962; Applequist, 1963). Das ist verständlich, wenn man bedenkt, daß sich aufgrund der Kooperativität des Denaturierungsvorganges eine Änderung der Gleichgewichtskonstanten des Propagationsschrittes* s sehr stark auf den Umwandlungsgrad Θ auswirkt. Sie wird nämlich mit der kooperativen Länge, die beim Kollagen etwa 200 Aminosäuren umfaßt, potenziert (Zimm et al., 1959 b).

Auf der anderen Seite ist die Gleichgewichtskonstante s durch eine einfache thermodynamische Gleichung mit der Änderung der Freien Energie verknüpft. Man kann also leicht ausrechnen, daß eine Änderung der Freien Energie um 0.18 kcal/Mol Kollagen ausreicht, um s von 0.9 nach 1.1 und da-

---

* Unter dem Propagationsschritt versteht man die Angliederung eines helicalen Aminosäurebausteins an ein bereits bestehendes helicales Segment. Aufgrund der Kooperativität ist dieser Schritt gegenüber einem Nucleationsprozess, d.h. der Umwandlung einer geknäuelten Aminosäure in den helicalen Zustand ohne die Nachbarwirkung einer helicalen Aminosäure, erheblich erleichtert (Zimm et al., 1959 b).

mit den Umwandlungsgrad Θ von 0 nach 1 zu verändern, d.h. also das Denaturierungsgleichgewicht vom nativen zum denaturierten Zustand zu verschieben.

Diese geringen Energien könnten bereits durch die Änderung der Wechselwirkungen aufgebracht werden, die sich aus der Einwirkung solvatisierter Salzpartikel auf die Hydrathülle des Kollagens ergibt. Deshalb wird im folgenden die Wirkung dieser Hydrate auf die stabilisierende Wasserhülle des Proteins für die denaturierende Wirkung der Salze verantwortlich gemacht:

Es ist bereits länger bekannt, daß flüssiges Wasser eine charakteristische, auf Ausbildung von H-Brücken beruhende Nahordnungsstruktur besitzt (vergl. z.B. Pauling, 1960; Wicke, 1966). Bei der Betrachtung der stark wirksamen Denaturierungsagenzien fällt nun auf, daß sie alle einen großen Einfluß auf diese Struktur ausüben: das Lithiumion und das Proton wirken z.B. stark polarisierend auf die Dipole des Wassers in ihrer Umgebung (vergl. Eigen, 1963; bzw. Wicke, 1966). Die polarisierende Wirkung nimmt jedoch umgekehrt proportional zum Ionenradius ab. Der Einfluß auf die Wasserstruktur steigt aber (parallel mit der denaturierenden Wirkung, vergl. Hippel und Wong, 1962) bei solchen Ionen wieder an, die in der Lage sind, Komplexe mit dem Wasser unter Beteiligung niedrig liegender pd-Hybridorbitale zu bilden. Auf diese Weise wirken sie ebenfalls polarisierend auf die Wasserstruktur. Die Nahordnungswirkungen sind stark; sie steigen mit der dritten Potenz der Konzentration des Elektrolyten an (Lietzke et al., 1968).
Analoges gilt für die polarisierbaren Anionen. Die Wirkungen von Anion und Kation verhalten sich additiv (Bello et al., 1956).

Der Harnstoff verhält sich ähnlich wie die Salzionen. Er ist nämlich befähigt, recht stabile Wasserstoffbrücken zum Wasser auszubilden. Die dadurch bedingte Abnahme der Elektronendichte

am Sauerstoff wird ausgeglichen durch die Resonanzbefähigung der freien Elektronenpaare der Stickstoffatome. Auf diese Weise werden die Wassermoleküle in Harnstofflösungen ebenfalls in einer bestimmten Stellung fixiert.

Auch die Wirkung von H-Ionen scheint in diese Vorstellungen zu passen: Aufgrund ihrer polarisierenden Wirkung üben Protonen die gleiche orientierende Wirkung auf benachbarte Wassermoleküle aus wie die ionischen Denaturierungsagenzien (Eigen, 1963). Allerdings scheint die Nahordnungswirkung geringer als bei den Salzen zu sein. Aus diesem Grunde liegt auch der ermittelte c_m-Wert etwas höher als für die anderen Denaturierungsmittel. Er wurde in dieser Arbeit zu etwa fünf Molen bei 20°C ermittelt.
Auch bei der Hitzedenaturierung spielt die Destabilisierung der Solvathülle durch die desorientierende Brown'sche Molekularbewegung sicher eine bedeutende Rolle.

Für das Kollagenmolekül andererseits muß man sich vorstellen, daß seine Struktur durch eine große Zahl von Ionen-, Dipol- und hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Wasser stabilisiert wird.
Es ist leicht einzusehen, daß diese Solvathülle bei Wechselwirkung mit den großen, polar ausgerichteten Salz-Wasserstrukturen eine tiefgreifende Neuorientierung erfährt, die in jedem Fall destabilisierend auf die Tertiärstruktur des Proteins wirkt. Die nichtorientierten Wasserdipole konkurrieren dabei mit den polar ausgerichteten um die "Bindungsstellen" am Protein. Steigt nun die Konzentration der orientierten Bereiche des Wassers stärker an, so daß sich gleichartig polarisierte Solvate, die mit dem Kollagenmolekül in Wechselbeziehung stehen, nähern, kommt es zu Abstoßungseffekten, die schließlich zum Zusammenbruch der Tertiärstruktur des Moleküls führen.

Die Umorganisation der Solvatstruktur des Kollagens kann man sich dabei so vorstellen, daß die polaren Komplexe die stärkst-

mögliche Wechselwirkung zu einer entgegengesetzt polarisierten Proteingruppierung eingehen. Die benachbarten, gleichnamig polarisierten Gruppen werden abgestoßen, drehen sich aus ihrer für die Tertiärstruktur des Moleküls stabilsten Lage und streben einen energetisch günstigen Kompromiß an.

Die Wirkung der Solvate ist unabhängig von der Konzentration des Proteins und nur proportional der Fähigkeit des Zentralatoms, die Wasserstruktur zu beeinflussen. Diese Größe ist eine Konstante des Denaturierungsmittels. Ob sie identisch ist mit der molaren Denaturierungswirksamkeit der Ionen oder Moleküle, kann erst entschieden werden, wenn man über die Beeinflussung der Wasserstruktur durch Salze und die Wechselwirkungen solvatisierter Salze mit dem Kollagen detailliertere Kenntnisse besitzt.

4. Experimenteller Teil

4.1. Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie (vergl. Pataki, 1966).

1. Freie Aminosäuren und Peptide

Phenol:Wasser = 75:25
Chloroform:Methanol:17 % NH_3 = 50:50:22.5
Butanol:Eisessig:Wasser = 8:2:2

C-terminale Aminosäuren wurden zweidimensional chromatographiert:
1. Dimension: Chloroform:Methanol:17 % NH_3 = 50:50:22.5
2. Dimension: Phenol:Wasser = 75:25 (+KCN)

2. "DANSyl"-Aminosäuren und -Peptide

Chloroform:Benzylalkohol:Eisessig = 140:60:6
Phenol:Wasser = 75:25

3. DNP-Aminosäuren

Ätherphase: 1. Dimension: Toluol:Pyridin:Äthylenchlorhydrin: 0.8 m NH_3 = 100:30:60:60.
Äquilibriert wurden die Platten mit der Unterphase, entwickelt mit der Oberphase.
2. Dimension: Benzol:Pyridin:Eisessig = 80:20:20

Wasserphase: Phenol:Wasser = 75:25
n-Propanol: 25 % NH_3 = 7:3

4.2. Beschreibung der Versuche.*

Versuch 1: Die Bromcyanspaltung.

In 0.1 m Citratpuffer (pH 3.7) gelöstes Kalbshautkollagen wurde durch mehrfaches Umfällen über Fibrillen (Dialyse gegen Leitungswasser und Fällen im isoelektrischen Bereich mit NaCl; Hafter und Hörmann, 1963) gereinigt. Die Fibrillen wurden in 0.05 %iger Essigsäure zu einer Konzentration von etwa 0.3 % gelöst und scharf zentrifugiert (20 000 UpM, 3 Stunden). Dieses Material zeigte in der Discelektrophorese keine Banden, die auf hydrolytischen Abbau hindeuteten.

Sodann wurde die Lösung auf 45°C erwärmt und 15 Minuten lang denaturiert. Hierbei sank die spezifische optische Drehung $[\alpha]^{45}_{405}$ auf den für denaturiertes Kollagen charakteristischen Wert von -360°.

1.1. Bei den anfänglichen Versuchen wurde sodann auf 32°C abgekühlt (vergl. Kap. 2.1.), pH 2 eingestellt und 48 Stunden lang in verschlossenen Kolben unter magnetischem Rühren mit Bromcyan (100-facher molarer Überschuß, bezogen auf den Methioningehalt) gespalten. Dann wurde tiefgefroren und gefriergetrocknet.

1.2. Spaltungskinetik bei 30 und 32°C.
Bei den Kinetikversuchen (Ansätze I - III) wurden die Kollagenlösungen nach der Wärmedenaturierung auf 30 (I) bzw. 32°C (II und III) abgekühlt und an der Glaselektrode pH 1 bzw. pH 2 und 2.5 eingestellt. Sodann wurden die Lösungen geteilt und zur einen Hälfte so viel festes Bromcyan zugefügt, daß die Lösung 0.1 m war (Ansätze A). Die andere diente als Kontrolle für die unspezifische Hydrolyse während

---

* Soweit es nicht schon notwendig war, im Ergebnis-Teil näher darauf einzugehen.

der Reaktion (Ansätze B). Zeitabhängig wurden Proben entnommen, tiefgefroren und gefriergetrocknet.

1.3. Spaltungskinetik in 75 %iger TFA.
Die berechnete Menge destillierter TFA wurde mit der berechneten Menge Bromcyan versetzt, so daß die Endkonzentration an CNBr 0.1 m betrug. Tropfenweise und unter Rühren wurden bei den Reaktionstemperaturen von 20 bzw. 34°C die denaturierten Kollagenlösungen (Ansätze IV und V) zugefügt. Die entnommenen Proben wurden auf 1/5 mit Wasser verdünnt und wie oben gefriergetrocknet; Kontrollen wie bei Versuch 1.2.

1.4. Spaltungskinetik nach Salzdenaturierung.
Wie oben gewonnene Kollagenlösungen wurden bei 20°C gegen 1 l Salzlösung (Konzentration wie in Tabelle 5 angegeben) 24 Stunden lang dialysiert (pH 1 bzw. 3.3). Sodann wurden die Lösungen geteilt und eine Hälfte mit festem Bromcyan bis zu einer Molarität von 0.1 versetzt (Ansätze VI A bis XIII A). Die andere (B) wurde wieder völlig identisch behandelt und diente als bromcyanfreie Kontrolle. Aliquote wurden entnommen und gefriergetrocknet. Anschließend wurde an Sephadex G 10 entsalzt (vergl. Versuch 3.3.).

1.5. Musterversuch: Spaltung bei 20°C nach Salzdenaturierung des Kollagens.
Für die Ansätze XIV und XV wurde wie oben gewonnenes Kollagen bei pH 1 bzw. pH 3.6 durch Dialyse gegen $CaCl_2$-Lösung denaturiert (Konzentrationen s. Tabelle 5) und anschließend gespalten, wie unter 1.4. beschrieben. Allerdings wurden keine Proben entnommen. Die Reaktionszeiten betrugen 30 bzw. 72 Stunden; sie waren aus den für Versuch 1.4. erhaltenen Kinetikkurven (Abb. 12), Ansätze VI und X für quantitative Spaltung extrapoliert worden. Die gefriergetrockneten Ansätze wurden an Biogel P 2 entsalzt, das sich für diesen Zweck geeigneter erwies als Sephadex G 10 (vergl. Versuch 3.3.).

1.6. Musterversuch: Spaltung bei 20°C nach Wärmedenaturierung des Kollagens.

Das Kollagen für Ansatz XVI wurde wärmedenaturiert wie unter 1. beschrieben; sodann wurde soviel 0.8 m $CaCl_2$-Lösung zugefügt, daß die Endkonzentration 0.4 m (= c_m, vergl. Tabelle 7) betrug. Sodann wurde wie in Versuch 1.4. gespalten. Die Reaktionszeit betrug 15 Stunden. Entsalzt wurde an Biogel P 2.

Versuch 2: Die Dialyse.

Je 25 mg Abbaugemisch wurden bei 4, 25 und 45°C gegen 0.05 %ige Essigsäure dialysiert. Die Vorlage wurde halbstündlich gewechselt und die Menge des Dialysats in Abhängigkeit von der Zeit mit Ninhydrin bestimmt.

Für präparative Zwecke wurden 250 mg Abbaugemisch in 100 ml 0.05 %iger Essigsäure 60 Minuten bei 25°C gegen 250 ml 0.05 %iger Essigsäure dialysiert.

Versuch 3: Sephadex-Chromatographie.

Sephadex wurde in dem jeweiligen Elutionsmittel aufgequollen. Das Gel wurde anschließend gewaschen und der Überstand dekantiert, bis die Partikelgröße einheitlich war. Sodann wurde im Wasserstrahlvakuum bei 50 bis 60°C entgast und in thermostatisierte Säulen gefüllt.

3.1. Vortrennung an Sephadex.

Bei der Vortrennung wurden Säulen mit Sephadex G 50, G 100 und G 200 verwendet (Maße : 3 x 105 und 2 x 55 cm). Die Aufgabe betrug 25 - 100 mg gespaltenes Protein, die Temperatur 20 bzw. 45°C, die Elutionsgeschwindigkeit 15 ml / Stunde und das Fraktionsvolumen 4 ml. Das Protein wurde mit 0.05 %iger Essigsäure eluiert und das Eluat bei 230 mu gemessen.

3.2. Entsalzung der an CM-Sephadex erhaltenen Fraktionen.
Die Fraktionen 1a - c aus Versuch 4 wurden an Sephadex G 25 entsalzt (Säulenmaße : 2.1 x 58 cm) mit 0.05 %iger Essigsäure bei 45°C und einer Elutionsgeschwindigkeit von 12 ml / Stunde.

3.3. Entsalzung der mit Salz denaturierten Proben.
Die salzdenaturierten Proben der Spaltungskinetik wurden bei den Ansätzen VI bis XIII an Sephadex G 10 (Säulenabmessungen: 1.1 x 130 cm) oder bei den Ansätzen XIV bis XVI an Biogel P 2 (Säulenmaße 2.5 x 150 cm) bei 20°C und einer Elutionsgeschwindigkeit von 35 ml / Stunde mit 0.05 %iger Essigsäure entsalzt. Die Eluate wurden direkt (230 mu) in einer Durchflußküvette (Beckman DB) gemessen und die Ergebnisse mit einem Schreibgerät registriert. 3 ml - Fraktionen wurden aufgefangen. Falls Salz und Protein nicht vollständig getrennt worden waren, wurde so fraktioniert, daß kein Protein verloren ging, gefriergetrocknet und rechromatographiert.

3.4. Die Auftrennung eines mit Kollagenase gewonnenen Peptidgemisches von Kollagen.
Es wurde versucht, mit Kollagenase abgebautes Kollagen (Puffer: 0.1 m Citratpuffer, pH 5.6, 10^{-3} m an Calciumacetat; Spaltbedingungen: Enzym : Substrat = 1 : 50, 6 Stunden bei 37°C) an Sephadex G 10 und G 15 (Säulenmaße 1.1 x 130 cm) aufzutrennen. Die Säule wurde an das Aminosäuregerät "Aminomat" angeschlossen und mit 30 ml 0.05 %iger Essigsäure pro Stunde eluiert. Das Eluat wurde zunächst bei 230 mu direkt in einer Durchflußküvette gemessen und über ein Schreibgerät registriert; sodann wurde in analytischen Versuchen (zur Ermittlung kleiner Peptide und Aminosäuren, die bei 230 mu keine Extinktion liefern) Ninhydrin zugepumpt, im Reaktionsknäuel der Farbstoff entwickelt und mittels Integraphen registriert.

Versuch 4: Trennungen an CM-Sephadex C 50.

CM-Sephadex wurde in 0.0033 m $CaCl_2$ (pH 4.5, I = 0.01) gequollen, gewaschen und äquilibriert. Anschließend wurde mit 30 ml 0.0033 m $CaCl_2$-Lösung eluiert (Proteinaufgabe 25 mg, Elutionsgeschwindigkeit 10 ml pro Stunde, Temperatur 40°C). Sodann wurde ein konkaver Gradient angelegt.

Das Gradientgefäß besaß ein konstantes Volumen und enthielt 500 ml 0.5 m $CaCl_2$ (pH 4.5, I = 1.5). Zwei Vorratsgefäße dienten der Regulierung der Steilheit des Gradienten. Zunächst wurde das Mischgefäß mit 3 m $CaCl_2$-Lösung (pH 4.5, I = 9) verbunden und eluiert, bis 35 ml hiervon verbraucht worden waren. Anschließend wurde auf das zweite Reservoir umgeschaltet. Von dieser Vorlage (2 m $CaCl_2$, pH 4.5, I = 6) wurden 250 ml benötigt. Dann wurde die Ionenstärke im Vorratsgefäß erneut auf I = 9 erhöht (160 ml). Die Endionenstärke im Mischgefäß betrug 3.1.
Für präparative Zwecke wurde später nur der mit der Ionenstärke 0.01 eluierbare Peak verwendet (Nr. 1a und 1b in Abb. 4 mit der hierbei nicht bezeichneten Schulter 1c). Säulenmaße 3 x 105 cm, Proteinaufgabe bis zu 500 mg gespaltenes Kollagen, Elutionsgeschwindigkeit 10 bis 15 ml pro Stunde, Temperatur 40°C; Ausbeute für diesen Peak 8 - 12 %.

Versuch 5: Trägerfreie Elektrophorese VaP II.

5.1. Auftrennung von Peptidgemischen bei pH 4.9.
Zunächst wurde versucht, das mit CNBr erzielte Peptidgemisch bzw. die erhaltene Hauptfraktion 1 (vergl. das Trennschema Seite 32) mit einem Puffer aufzutrennen, dessen pH im isoelektrischen Bereich des Kollagens liegt: Verwendet wurde als Elektrodenpuffer 0.1 m Natriumacetat, als Trennkammerpuffer 0.033 m Natriumacetat (pH 4.9, $\varkappa$ = 0.0035 $\Omega^{-1} \cdot cm^{-1}$). Die Puffergeschwindigkeit betrug 80 ml pro Stunde, die Einspritzdosierung 0.4 bis 1 ml pro Stunde bei einer Proteinkonzentration von 6 mg pro ml. Eingespritzt

wurde zentral. Die Spannung betrug 2 000 bis 2 050 V (die Feldstärke also etwa 40 V pro cm), die Stromstärke 130 mA und die Arbeitstemperatur 4.5 bis 5°C.

5.2. Auftrennung der in 5.1 erhaltenen sauren Fraktion. Verwendet wurde ein Puffer, der 0.6 m an Ameisensäure und 0.5 m an Essigsäure war. Er diente als Elektrodenpuffer und wurde für die Trennkammer 1:5 verdünnt ($\varkappa = 0.00132\ \Omega^{-1} \cdot cm^{-1}$, pH 1.8). Die Puffergeschwindigkeit betrug in diesen Versuchen ca.100 ml / Stunde, die Einspritzdosierung 1.5 ml / Stunde und die Proteinkonzentration 2.5 mg / ml. Eingespritzt wurde zentral. Die Spannung betrug 2 400 V (die Feldstärke also 48 V / cm), die Stromstärke 150 mA und die Temperatur 3.5°C.

Versuch 6: Discelektrophorese

(Herstellerfirma: Pleuger / Nijmegen, Belgien)

Die Gele wurden wie folgt präpariert:

Zweischichtiges Gel: Unteres Gel

1. 7.5 % Acrylamid
   Lösung a: 12 ml 1 n KOH, 4.3 ml Eisessig, 1 ml N,N,N',N'- Tetramethyläthylendiamin (Temed), aufgefüllt mit Wasser auf 25 ml; pH 4.37
   b: 15 g Acrylamid und 0.4 g N,N'- Methylen-bis -Acrylamid (Bis), gelöst zu 50 ml
   c: 25 ml 4 - 8 m Harnstoff
   d: 140 mg Ammoniumpersulfat in 100 ml Wasser
2. 15 % Acrylamid
   Lösungen a, c und d wie unter 1.
   b: 30 g Acrylamid und 0.2 g Bis gelöst zu 50 ml

Die Lösungen wurden gemischt (a : b : c : d : = 1 : 2 :

1 : 4), in Elektrophoreseröhrchen gefüllt, zur Erzielung ebener Oberflächen mit etwas Wasser überschichtet und 20 bis 30 Minuten unter einer UV - Lampe polymerisiert. Der nichtpolymerisierte Überstand wurde verworfen.

Oberes Gel:

2.5 % Acrylamid

Lösung e: 12 ml 1 n KOH, 0.72 ml Eisessig, 0.12 ml Temed, aufgefüllt mit Wasser auf 25 ml; pH 8.55

f: 2.5 g Acrylamid, 0.62 g Bis, gelöst zu 25 ml

g: 1 mg Riboflavin in 25 ml Wasser

h: 25 ml 2 - 4 m Harnstoff

Die Lösungen wurden gemischt (e : f : g : h = 1 : 2 : 1 : 4) und wie das untere Gel polymerisiert.

Die Proben (0.1 bis 0.01 ml, enthaltend 15 bis 40 ug Kollagen oder 100 bis 200 ug Abbaupeptide) wurden in Elektrodenpuffer gelöst, der 2 - 4 m an Harnstoff war und zur Dichteerhöhung mit Glucose versetzt wurde.

Zur Trennung wurden folgende Elektrodenpuffer verwendet:

Zur Trennung von Kollagenuntereinheiten:

1. 31.2 g ß-Alanin, 8 ml Eisessig und eine Spatelspitze Aureomycin gelöst zu 1 l, pH 4.2 bis 4.8 (Reisfeld et al., 1962)
2. 0.05 m Natriumacetat, pH 4.2 bis 4.8 (Veis und Anesey, 1965)

Zur Trennung von Kollagenabbaupeptiden:

3. 25 ml Ameisensäure, 78 ml Eisessig, aufgefüllt auf 1 l, pH 1.8, $\varkappa = 0.0092\,\Omega^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Die Stromstärke betrug 4 mA pro Röhrchen.
Bei elektrophoretischer Anfärbung wurde folgendermaßen ver-

fahren: nach zwei Stunden (bzw. 1/2 Stunden im Falle von Puffer 3) wurde der Kathodenpuffer durch eine 0.1 - 1 %ige Lösung von Amidoschwarz 10 B in dem gleichen Puffer ersetzt und der Strom erneut eingeschaltet, bis der Farbstoff zum Anodenraum gewandert war. Zur elektrophoretischen Entfärbung wurde die Apparatur umgepolt, um ein Nachschleppen des am unteren Ende der Röhrchen besonders intensiven Farbstoffs zu vermeiden.

Besonders bei der Trennung von Abbaupeptiden wurde jedoch folgendermaßen entfärbt: Die 15 Minuten lang mit einer 1 %igen Lösung von Amidoschwarz 10 B in 7 %iger Essigsäure angefärbten Gelzylinder wurden in einen Entfärbeapparat gelegt. Dieser bestand aus sternförmig angeordneten, von Kämmen begrenzten Kammern, die an einer zentralen Achse gedreht wurden. Die Gelzylinder wurden auf diese Weise permanent vom Entfärbungsmittel (7 %ige Essigsäure) umspült, dessen Volumen 10 bis 12 l betrug. Nach diesem Verfahren ließen sich sogar 15 %ige Gele über Nacht entfärben.

Versuch 7: Aminosäureanalyse am Analysator BC 200 der Fa. Bio-Cal ("Biochrom").

Für die Hydrolyse wurde frische, analysenreine, rauchende Salzsäure (1 : 1 verd. = 6 n) verwendet. Es war festgestellt worden, daß sie gegenüber der azeotrop destillierten (5.7 n) keinen Nachteil besaß. In jedem Falle wurde auf Chlorfreiheit geachtet.
1 - 3 mg Protein wurden in abgeschmolzenen Kölbchen 24 Stunden lang bei 108° C unter Stickstoffatmosphäre (gereinigt durch Pyrogallollösung und H_2SO_4, 1 : 1 verd.) hydrolysiert. Sodann wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, dreimal mit Wasser aufgenommen und erneut eingeengt, um die Salzsäure zu entfernen.
Das Hydrolysat wurde dann in Citratpuffer vom pH 2.2 aufgenommen, ein Aliquot auf die Trennsäule des Analysators gegeben und mit Puffer vom pH 2.2 durch Stickstoffdruck in das Harz-

bett eingepreßt.
Die verwendeten Pufferprogramme sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Elutionsprogramme für den "Biochrom" Aminosäure Analysator:

I. Normalkollagen.			II. Kollagen, unter Berücksichtigung der zusätzlichen Abtrennung von 3-Hyp, Met-S-oxid und Hse.		
Puffer-pH	Temp. (°C)	Ges.zeit (min.)	Puffer-pH	Temp. (°C)	Ges.zeit (min.)
3.04	60	15	2.84	42	4
3.23	60	45	2.84	60	35
3.23	50	55	3.04	60	83
4.05	50	65	4.05	50	112
4.65	50	83	4.65	50	132
0.2n NaOH	50	95	0.2n NaOH	50	144
3.04	50	110	2.84	50	152
3.04	42	115	2.84	42	175

Der Startpuffer enthielt jeweils 40 ml Methanol pro Liter zur besseren Trennung von Serin und Threonin.
Die Puffergeschwindigkeit betrug 105, die des Ninhydrins 35 ml/Std. Die Regenerierung der Säule wurde bereits begonnen während sich noch die letzten Aminosäuren auf der Säule befanden.
Die erhaltenen Peaks wurden unter der Annahme von Gauss-Kurven ausgewertet. Ermittelt wurde das Produkt aus logarithmischer Höhe und der Zahl der Druckpunkte des Schreibers über der Halbwertshöhe. Der Wert wurde mit einer Test-

analyse (gleiche Ninhydrincharge) verglichen.

Versuch 8: Die Endgruppenanfärbung mit Ninhydrin.

Die Proteinproben wurden unter Rühren in 0.1 m Citratpuffer, pH 4.5, gelöst, die Konzentration durch Stickstoffbestimmung (Strauch, 1965) genau ermittelt (Umrechnungsfaktor: 5.84 . ug N = ug Kollagen; für den N-Gehalt des Kollagens s. Schleyer, 1960). Sodann wurden 0.3 bis 0.4 ml entnommen, enthaltend 10 bis 30 uMol erwarteter Endgruppen, mit 1 ml frischem Ninhydrinreagenz versetzt und 20 Minuten lang in verschlossenen Gläsern im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Anschliessend wurde mit n-Propanol / Wasser (= 1 : 1) auf 5 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 575 mu gemessen. Zur Bestimmung des molaren Endgruppenzuwachses in Abhängigkeit von der Zeit wurden Kollagen, die gespaltenen Proben und die bromcyanfreien Kontrollen nach der oben beschriebenen Methode angefärbt. Aus der gemessenen Extinktion wurde die für 300 ug Protein berechnet und die für 300 ug Kollagen jeweils in Abzug gebracht (vergl. Tabelle 2). Die Differenz wurde mittels einer Leucin-Eichgeraden in Leucinäquivalente pro Mol Kollagen umgerechnet. Die Kontrollen geben den molaren Endgruppenzuwachs durch die unspezifische Hydrolyse, die mit Bromcyan behandelten Proben die durch die Gesamtspaltung verursachte Zunahme der Endgruppen wieder. Die Differenz entsprechender Kurvenwerte gibt die Kurve für den zeitlichen Verlauf der spezifischen Spaltung der Methionbindung.
Es wurden jeweils Doppelbestimmungen - beim unbehandelten Kollagen Sechsfachbestimmungen aus drei Einwaagen - durchgeführt. Sowohl die Ninhydrin- wie auch die Stickstoffbestimmung wurde wiederholt, wenn die Abweichung beider Werte voneinander mehr als 2 % betrug.

Versuch 9: Die Hydroxyprolinbestimmung.

0.1 ml Probevolumen, enthaltend 2 bis 20 ug Hydroxyprolin, wurde mit 0.2 ml 2.5 m NaOH 3.5 Stunden lang bei 90°C

hydrolysiert.
Nach dem Abkühlen wurde mit 0.2 ml 30 %iger Essigsäure neutralisiert und mit 0.5 ml Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Sodann wurde (nach Chvapil und Hurych, 1962) mit 1 ml 0.33 m Toluolsulfonamidchlorid (Chloramin T) versetzt und 20 Minuten lang oxydiert. Anschließend wurde mit 1 ml 3 m $HClO_4$ und nach fünfminütigem Stehenlassen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd versetzt, geschüttelt und auf dem Wasserbad durch Erwärmen auf 60°C zum roten Farbstoff gekuppelt. Gemessen wurde die Extinktion bei 555 mu.

Versuch 10: Die Dinitrophenylierung.

10.1. Darstellung der DNP-Aminosäuren.
Etwa 1.5 mg Peptid wurden mit 0.15 ml 2 %iger $NaHCO_3$-Lösung und 20 ul DNFB 30 Minuten lang bei 40°C im Dunkeln geschüttelt. Sodann wurde i.V. getrocknet und überschüssiges Reagenz mit Äther extrahiert. Anschließend wurde bei 105°C acht Stunden lang hydrolysiert, verdünnt und mit Äther extrahiert. Die Wasserphase wurde mit sek. Butanol/Essigester (1 : 1) erneut ausgeschüttelt und beide Phasen getrennt chromatographiert (vergl. Kap. 4.1.3.).

10.2. Molekulargewichtsbestimmung nach der DNP-Methode (Graßmann et al., 1962).
Die DNP-Peptide wurden dargestellt und isoliert, wie vorstehend für die Aminosäuren beschrieben, die organischen Phasen wurden vereinigt, getrocknet und in Eisessig aufgenommen. Für den aus der Aminosäureanalyse ermittelten Gehalt an ε-Aminosäuren wurde mit Hilfe einer Eichgeraden für ε-DNP-Lysin die Extinktion pro uMol Kollagen errechnet und von der bei 390 mu für 1 uMol Abbaugemisch gemessenen Extinktion subtrahiert. Aus der Differenz wurde das Molekulargewicht berechnet. Zur Eichung dienten Mittelwerte der aus Eichgeraden gewonnenen Extinktionen für DNP-Gly, DNP-Ala, DNP-Glu und DNP-Leu.

Versuch 11: Die Hydrazinolyse.

Zu 5 bis 50 mg Peptid wurde wasserfreies Hydrazin (dreimal über NaOH und KOH destilliert; Braunitzer, 1954, 1955) in zehnfachem Überschuß zugefügt und dann neun Stunden lang bei 105°C i.V. hydrazinolysiert.
Überschüssiges Hydrazin wurde rasch i.V. über konzentrierter Schwefelsäure abgezogen, der Rückstand in 5 ml Wasser gelöst und mit 10 ml an p-Nitrobenzaldeyd gesättigtem Essigester zwei Stunden lang geschüttelt. Von den ausgefallenen Hydraziden wurde abgesaugt und das Filtrat mit Essigester, Propanol und schließlich Äther extrahiert bis es farblos war. Die wässrige Phase enthält die C-terminalen Aminosäuren und wurde chromatographiert, wie unter 4.1.1. beschrieben.

Versuch 12: Die Salzdenaturierung.

12.1. Ermittlung der zur Denaturierung des Kollagen erforderlichen Salzkonzentrationen.

Kollagenlösungen in 0.05 %iger Essigsäure wurden bei 20°C und pH 1 bzw. pH 3.3 mit festem Denaturierungsmittel versetzt und die optische Drehung in thermostatisierten Küvetten (20°C) gemessen. Es wurde darauf geachtet, daß sich der jeweilige Gleichgewichtszustand eingestellt hatte, d.h. der Wert des Drehwinkels konstant blieb. Die Zeit zwischen Salzzugabe und Messung betrug 8 bis 24 Stunden (vergl. Versuch 12.2.).
Der graphischen Darstellung der Abhängigkeit der optischen Drehung von der Salzkonzentration (s. Abb. 15 und Abb. 17) wurde eine lineare Abhängigkeit des jeweiligen Denaturierungsgrades von der Winkeldifferenz $\alpha_o - \alpha$ zugrunde gelegt. (Dabei ist α_o der Anfangswinkel und α der Wert bei einer bestimmten Salzkonzentration.)

12.2. Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Denaturierungskonzentration c_m.

Die Kollagenlösungen wurden zunächst gegen einen Puffer dialysiert, der je 0.01 m Citrat und Tris enthielt. Sodann wurde

bei 20°C gegen 1 l des gleichen Puffers dialysiert, der zusätzlich das denaturierende Salz enthielt. Die Konzentration an Denaturierungsmittel (GuSCN und Harnstoff) im Puffer wurde stufenweise erhöht. Nach jeder Salzzugabe wurde der (konstant gehaltene) pH-Wert nachgestellt. Zu Beginn und am Ende der Denaturierungskurven wurde nach 6 - 8 Stunden, in der Nähe des Phasenüberganges nach 18 - 24 Stunden in thermostatisierten Küvetten (20°C) die optische Drehung bei 405 mu gemessen. Um das Kollagenvolumen konstant zu halten, wurde es vor und nach der Dialyse gemessen. Osmotische Verluste wurden durch Puffer der Vorlage ausgeglichen. Analoge Versuchsreihen wurden bei allen untersuchten pH-Werten durchgeführt.

5. Literaturverzeichnis

Akabori, S., T. Ohno und K. Narita, Bull. Soc. Japan 25, 214 (1952)

Allison, A. und M. Grice, Biochemistry 1, 694 (1962)

Anfinsen, C.B., M. Rumley und H. Taniuchi, A. Chem. Scand. 17, 270 (1963)

Aoyama, M., K. Kurihara und K. Shibata, Biochim. Biophys. Acta 107, 257 (1965)

Applequist, J., J. Chem. Phys. 38, 934 (1963)

Atassi, M.Z., Arch. Biochem. Biophys. 120, 56 (1967)

Bargetzi, J.P., E.O.P. Thompson, K.S.V. Sampath Kumar, K.A. Walsh und H. Neurath, J. Biol. Chem. 239, 3767 (1964)

Bello, J., H.C.A. Riese und J.R. Vinograd, J. Phys. Chem. 60, 1299 (1956)

Bello, J., H.R. Bello und J.R. Vinograd, Biochim. Biophys. Acta 57, 222 (1962)

Benisek, W.F. und R.D. Cole, Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 655 (1965)

Bergmann, M., E. Brand und F. Weinmann, Z. physiol. Chem. 131, 1 (1923)

Bergmann, M. und A. Miekeley, Z. physiol. Chem. 140, 128 (1924)

Black, J.A. und E. Leaf, Biochem. J. 96, 693 (1965)

Bodo, G., in "Fortschritte d. Chem. Forschg." 6 (Heft 1), 1 (1966)

Bornstein, P. und K.A. Piez, Science 148, 1353 (1965)

Bornstein, P., A.H. Kang und K.A. Piez, Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 417 (1966 a)

Bornstein, P. und K.A. Piez, Biochemistry 5, 3460 (1966 b)

Bornstein, P., A.H. Kang und K.A. Piez, Biochemistry 5, 3803 (1966 c)

Bornstein, P., Biochemistry 6, 3082 (1967); J. Biol. Chem. 242, 2572 (1967)

Braunitzer, G., Z. Natf. 9 b, 675 (1954) et Chem. Ber. 12, 2025 (1955)

Braunitzer, G., K. Beyreuther, H. Fujiki und B. Schrank, Z. physiol. Chem. 349, 265 (1968)

Mc Bride, O.W., und W.F. Harrington, Biochemistry 6, 1499 (1967)

Butler, W.T., K.A. Piez und P.Bornstein, Biochemistry 6, 3771 (1967)

Cahnmann, H.J., R. Arnon und M. Sela, J. Biol. Chem. 240, PC 2762 (1965)

Chvapil, M. und J. Hurych, Kozarstvi 12, 293 (1962); referiert in J. Am. Leather Chem. Assoc. 58, 444 (1963) und Collagen Currents 4, 3 (1963)

Corey, E.J. und L.F. Haefele, J. Am. Chem. Soc. 81, 2225 (1959)

Davidson, B.E., M. Sajgo, H.F. Noller und J.I. Harris, Nature 216, 1181 (1967)

Davis, B.J., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)

Deyl, Z., J. Rosmus und S. Bump, Biochim. Biophys. Acta 140, 515 (1967 a)

Deyl, Z., H. Malkova und J. Rosmus, Experientia 23, 518 (1967 b) et ibid. 723 (1967 c)

Dick, Y.P. und A. Nordwig, Arch. Biochem. Biophys. 117, 466 (1966)

Drapeau, G.R. und C. Yanofsky, J. Biol. Chem. 242, 5434 (1967)

Edmundson, A.B., Nature 198, 354 (1963), ibid. 205, 883 (1965); A.B. Edmundson und C.H.W. Hirs, J. Mol. Biol. 5, 706 (1965), ibid. 683 (1965)

Eigen, M., Angew. Chem. 75, 489 (1963)

Franzblau, C., Diss. Yeshiva University (1962)

Franzblau, C., S. Seifter und P.M. Gallop, Biopolymers 2, 185 (1964)

Francois, C.J. und M.J. Glimcher in "Biochemie et Physiologie du Tissu Conjonctiv", Lyon 1965, pp. 531; et Biochim. Biophys. Acta 133, 91 (1967a) et Biochem. J. 102, 149 (1967 b)

Frank, G. und G. Braunitzer, Z. physiol. Chem. 348, 1691 (1967)

Funatsu, M., N.M. Green und B. Witkop, J. Am. Chem. Soc. 86, 1846 (1964)

Gelotte, B., J. Chromatog. 3, 330 (1960)

Graßmann, W., A. Riedel und Th. Altenschöpfer, Kolloid Z. 186, 50 (1962)

Graßmann, W., J. Engel, K. Hannig, H. Hörmann, K. Kühn und A. Nordwig in "Fortschritte d. Chem. org. Naturstoffe"; Herausg.: L. Zechmeister; Bd. 23, pp. 195; Springer Verlag, Wien 1965

Gray, W.R. und B.S. Hartley, Biochem. J. 89, 59 P (1963)

Gross, E. und B. Witkop, J. Am. Chem. Soc. 83, 1510 (1961); J. Biol. Chem. 237, 1856 (1962); Biochemistry 6, 745 (1967)

Gross, E., in "Methods in Enzymology"; Herausg.: C.H.W. Hirs; Bd. 11, pp. 238; Academic Press, London und New York 1967

Gross, J. in "Comparative Biochemistry; A Comprehensive Treatise", Editors M. Florkin und H. S. Mason; pp. 324, New York 1963

Hafter, R. und H. Hörmann, Z. physiol. Chem. 330, 169 (1963)

Hannig, K., Clin. Chim. Acta 4, 51 (1959)

Hannig, K.; Z. physiol. Chem. 338, 211 (1964) und in "Protides

of the Biol. Fluids", Brügge, 15, 523 Amsterdam 1967

Hannig, K. und A. Nordwig in "Treatise on Collagen"; Herausgeber: G.N. Ramachandran, Bd. 1, pp. 73, London und New York 1967

Heidrich, H.G. und L.K. Wynston, Z. physiol. Chem. 242, 166 (1965)

Hill, R.L., Adv. Prot. Chem. 20, 37 (1965)

Hine, J. in "Physical Organic Chemistry", 2nd ed., pp. 141, Mc Graw Hill Book Company, New York 1962

v.Hippel, P.H. und K.Y. Wong, Biochemistry 1, 664 (1962) und Biochemistry 2, 1387 (1963 a) et ibid. 1399 (1963 b)

Hirs, C.H.W., Ann. Rev. Biochem. 33, 597 (1964)

Hofmann, T., Biochemistry 3, 356 (1964)

Holmgren, A. und P. Reichard, Europ. J. Biochem. 2, 181 (1967)

Hörmann, H. und K.T. Joseph, Biochim. Biophys. Acta 100, 598 (1965 a)

Hörmann, H., K.T. Joseph und M.v.Wilm, Z. physiol. Chem. 341, 284 (1965 b)

Iselin, B., Helv. Chim. Acta 44, 61 (1961)

Izumiya, N., J.E. Francis, A.V. Robertson und B. Witkop, J. Am. Chem. Soc. 84, 1702 (1962)

Kang, A.H., P. Bornstein und K.A. Piez, Biochemistry 6, 788 (1967)

King, T.P., Biochemistry 5, 3454 (1966)

Kühn, K. und E. Zimmer, Z. Natf. 16 b, 648 (1961)

Kühn, K., Ch. Tkocz, B. Zimmermann und G. Beier, Nature 208, 685 (1965)

Kühn, K., Naturwiss. 54, 101 (1967)

Kühn, K. und M. Stark, Europ. J. Biochem. (im Druck)

Kurihara, K., H. Horinishi und K. Shibata, Biochim. Biophys.

Acta 74, 678 (1963)

Lenard, J. und G.P. Hess, J. Biol. Chem. 239, 3275 (1964)

Lietzke, M.H., R.W. Stroughton und R.M. Fuoss, Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 39 (1968)

Mandl, J., Adv. in Enzymology 23, 163 (1961)

Markland, F.S. und E.L. Smith, J. Biol. Chem. 242, 5198 (1967)

Moore, S. und W.H. Stein, J. Biol. Chem. 176, 367 (1948); zur Ausführung vergl. W. Graßmann und A. Nordwig, Z. physiol. Chem. 322, 267 (1960)

Moore, S. und W.H. Stein, J. Biol. Chem. 211, 893 (1954) et ibid. 907 (1954)

Näntö, V., J. Maatela und E. Kulonen, A. Chem. Scand. 17, 1604 (1963)

Näntö, V., J. Pikkarainen und E. Kulonen, J. Am. Leather Chem.Assoc. 60, 63 (1965)

Noltmann, E.A., T.A. Mahowald und S.A. Kuby, J. Biol. Chem. 237, 1146 (1962)

Nordwig, A., Diss. München (1961)

Nordwig, A., Leder 13, 10 (1962)

Nordwig, A. und Y.P. Dick, Biochim. Biophys. Acta 97, 179 (1965)

Nordwig, A. und W. Bandlow, Z. physiol. Chem. 349, 148 (1968)

Ornstein, L., Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)

Partridge, S.M. und H.F. Davis, Nature 165, 62 (1950)

Pataki, G., in "Dünnschichtchromatographie", de Gruyter und Co., Berlin 1966

Patchornik, A. und S. Shaltiel, in "The Peptides": Proc. 6th Europ. Symp. Athens, pp. 177, Oxford 1963

Patchornik, A., M. Wilchek und S. Sarid, J. Am. Chem. Soc.

86, 1457 (1964)

Pauling, L., in "The Nature of the Chemical Bond", Cornell University Press, Ithaka, New York 1960

Piez, K.A. und J. Gross, Biochim. Biophys. Acta 34, 24 (1959)

Piez, K.A., E. Weiss und M.S. Lewis, J. Biol. Chem. 235, 1987 (1960)

Piez, K.A., M.S. Lewis, G.R. Martin und J. Gross, Biochim. Biophys. Acta 53, 596 (1961)

Piez, K.A., E.A. Eigner und M.S. Lewis, Biochemistry 2, 58 (1963)

Piez, K.A., G.R. Martin, A.H. Kang und P. Bornstein, Biochemistry 5, 3813 (1966)

Porath, J. und P. Flodin, Nature 183, 1657 (1959)

Porath, J., Biochim. Biophys. Acta 39, 193 (1960)

Previero, A., M.A. Coletti-Previero und P. Jollés, Biochem. Biophys. Res. Comm. 22, 17 (1966), Biochim. Biophys. Acta 124, 400 (1966); J. Mol. Biol. 24, 261 (1967 a)

Previero, A., M.A. Coletti-Previero und J.C. Cavadore, Biochim. Biophys. Acta 147, 453 (1967 b)

Previero, A., M.A. Coletti-Previero und C. Axelrud-Cavadore, Arch. Biochem. Biophys. 122, 434 (1967 c)

Ramachandran, G.N. und G. Kartha, Nature 174, 269 (1954) und 176, 593 (1955)

Ramachandran, G.N., "Treatise on Collagen"; Herausgeber: G.N. R. Academic Press, London 1967

Raymond, S. und L.S. Weintraub, Science 130, 711 (1959)

Reich, G., "Kollagen"; Th. Steinkopff, Dresden 1966

Reisfeld, R.A., U.J. Lewis und D.E. Williams, Nature 195, 281 (1962)

Rich, A. und F.H.C. Crick, Nature 176, 915 (1955) und J. Mol. Biol. 3, 438 (1961)

Rubin, A.L., M.P. Drake, P.F. Davison, D. Pfahl, P.T. Speakman und F.O. Schmitt, Biochemistry 4, 181 (1965)

Ruttenberg, M.A., T.P. King und L.C. Craig, Biochemistry 3, 758 (1964)

Sanger, F., Biochem. J. 39, 507 (1945)

Sanger, F., Adv. Prot. Chem. 7, 1 (1952)

Schleyer, M., Diss. München (1960)

Schroeder, W.A., W.A. Legette, J.R. Shelton, J.B. Cormick und R.T. Jones, Biochemistry 2, 992 (1963)

Scoffone, E., A. Previero, C.A. Benassi und P. Pajetta, in "The Peptides": Proc. 6th Europ. Symp. Athens, pp. 183, Oxford 1963

Shaltiel, S. und A. Patchornik, J. Am. Chem. Soc. 85, 2799 (1963)

Smith, E.L., F.S. Markland, C.B. Kasper, R.J. De Lange, M. Landon und W.H. Evans, J. Biol. Chem. 241, 5974 (1960)

Smithies, O., Adv. Prot. Chem. 14, 65 (1959)

Stark, M. und K. Kühn, Leder 17, 21 (1967)

Steers, E., E.R. Craven und C.B. Anfinsen, J. Biol. Chem. 240, 2478 (1965)

Stegemann, H., Z. physiol. Chem. 311, 41 (1958) und H. Stegemann und K. Stalder, Clin. Chim. Acta 18, 267 (1967)

Stegemann, H., Z. physiol. Chem. 319, 87 (1960)

Strauch, L., Z. klin. Chem. 3, 165 (1965)

Strauch, L., in "Protides of the Biol. Fluids", Brügge, 15, 535; Amsterdam 1967

Taniuchi, H. und C.B. Anfinsen, J.Biol. Chem. 241, 4366 (1966)

Taniuchi, H., C.B. Anfinsen und A. Sodja, J. Biol. Chem. 242, 4736, 4752 (1967)

Toi, K., E. Bymm, E. Norris und H.A. Itano, J. Biol. Chem. 242, 1036 (1967)

Tristram, G.R. und R.H. Smith, Adv. Prot. Chem. 18, 227 (1963)

Veis, A. und J. Anesey, J. Biol. Chem. 240, 3899 (1965)

Walsh, K.A., D.L. Kauffman, K.S.V. Sampath Kumar und H. Neurath, Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 301 (1964)

Wicke, E., Angew. Chem. 78, 1 (1966)

Wilchek, M. und B. Witkop, Biochem. Biophys. Res. Comm. 26, 296 (1967)

Williams, D.E. und R.A. Reisfeld, Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 373 (1964)

Witkop, B. und L.K. Ramachandran, in "The Peptides": Proc. 6th Europ. Symp. Athens, pp. 165, Oxford 1963

Yanofsky, C., G.R. Drapeau, J.R. Guest und B.C. Carlton, Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 296 (1967)

Yukawa, Y., in "Handbook of Org. Structural Analysis", pp. 519, Herausg.: Y. Yukawa, Verlag W.A. Benjamin, New York und Amsterdam 1965

Zimm, B.H. und J.K. Bragg, J. Chem. Phys. 28, 1246 (1956); ibid. 31, 526 (1959 a)

Zimm, B.H., P. Doty und K. Iso, Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 1601 (1959 b)

Zimm. B.H., in "Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins", Proc. Int. Symp. Univ. Wisconsin, 1961, pp. 229, Herausg.: M.A. Stahmann, Madison 1962

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die methioninspezifische Bromcyanreaktion auf Kollagen angewendet. Im Verlaufe dieser Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Mit zwei voneinander unabhängigen analytischen Verfahren wurde festgestellt, daß bei der Spaltung von wärmedenaturiertem Kollagen (pH 1 bis pH 2.5 und 30 bis 32°C) unspezifische Hydrolysen ablaufen, die quantitativ erheblich sind und eine Trennung der Abbaupeptide erschweren. Durch Endgruppen- und Molekulargewichtsbestimmungen des bei der Reaktion entstehenden Peptidgemisches wurde sichergestellt, daß es sich bei den Nebenreaktionen um echte Peptidolysen handelt. Dafür wird neben dem sauren Milieu der Spaltungsansätze eine teilweise Zerstörung von Serin und Tyrosin verantwortlich gemacht.

2. Eine weitgehende Zurückdrängung der unspezifischen Hydrolyse gelingt durch Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 20°C. Der denaturierte Zustand des Kollagens wird dabei durch Zusatz von $CaCl_2$ aufrecht erhalten. Die Methioninspaltung verläuft unter diesen Bedingungen (pH 1) quantitativ; ihre Geschwindigkeit ist in Gegenwart von denaturierenden Salzen und Harnstoff allerdings verlangsamt.

3. Die Bromcyanreaktion verläuft insgesamt nach der 1. Reaktionsordnung. Es wurde wahrscheinlich gemacht, daß die pseudomonomolekular verlaufende S-Cyanierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Reaktionskonstanten k_1 für 30°C und pH1 bzw. pH 2 wurden gemessen.
Die Reaktionsgeschwindigkeit zeigt eine deutliche pH-Abhängigkeit; sie fällt mit steigendem pH des Mediums stark ab. Das kann nicht mit dem in der Literatur vorgeschlagenen Mechanismus der Reaktion in Einklang gebracht werden. Der Befund wird als eine pH-abhängige Beteiligung geladener

Seitenketten des denaturierten Proteins an der CNBr-Reaktion gedeutet.

4. Die Denaturierung des Kollagens mit Salzen wurde eingehender untersucht. In Analogie zu der bei der Wärmedenaturierung gebräuchlichen Größe T_m wurde eine Denaturierungskonzentration c_m definiert und die entsprechenden Werte für Guanidiniumrhodanid und -chlorid, $CaCl_2$, LiBr und Harnstoff bei 20°C bestimmt. c_m ist pH-abhängig; dieser Zusammenhang wird quantitativ beschrieben, eine pH-Abhängigkeitskonstante K' abgeleitet und aus den Meßdaten für die angegebenen Salze berechnet.

Es wird wahrscheinlich gemacht, daß Wasserstoffionen bei der Denaturierung von Proteinen neben der Einflußnahme auf den Ladungszustand der Carboxyl- bzw. ε-Aminogruppen in den Seitenketten im Prinzip wie Salzionen wirken.
Für die Denaturierung von Proteinen wird am Beispiel des Kollagens ein Mechanismus vorgeschlagen, der weitgehend auf einer Destabilisierung der Solvathülle des Proteinmoleküls beruht.

5. Für den automatischen Aminosäureanalysator BC-200 ("Biochrom") wurde ein Programm ausgearbeitet, das die besonderen Verhältnisse der Proteinhydrolysate der vorliegenden Arbeit berücksichtigt, d.h. die Trennung der Aminosäuren Hydroxyprolin und Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure und Prolin und zugleich die Bestimmung von 3-Hydroxyprolin, Methioninsulfoxid und Homoserin ermöglicht.

6. Es wurde ein discelektrophoretisches Verfahren entwickelt, das die schnelle Auftrennung kleiner Kollagenbruchstücke im analytischen Maßstab erlaubt. Der Anfärbe- und Entfärbevorgang wurde vereinfacht und beschleunigt.

L e b e n s l a u f

Wolfhard Bandlow

geboren	am 11. März 1938 in Wesermünde (jetzt Bremerhaven) als Sohn des Staatsanwaltes Gerhard Bandlow (gefallen 1942) und seiner Ehefrau Ilse, geb. Genzmer
Volksschule	1945 bis 1949 in Bremerhaven
Höhere Schule	1949 Eintritt in die Wilhelm-Raabe-Schule (Humanistisches Gymnasium) in Bremerhaven, dort Abitur 1957.
Universität	Immatrikuliert an der Universität Marburg/Lahn ab WS 1957/58. Studium der Chemie. Diplom-Vorexamen Oktober 1960 in Marburg. Unterbrechung durch eine 3-semestrige Werkstudententätigkeit zur Studienfinanzierung. Diplom-Hauptprüfung 1965 in München. Seit Juli 1965 Diplom- und Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München.
verheiratet	mit Hildegard Bandlow, geb. Wlecke, seit Dezember 1966.

Meine akademischen Lehrer waren:

Bock, Dannenberg, Dimroth, E.O. Fischer, Graßmann, Hafner, Hug, Huisgen, F. Kaudewitz, H. Kuhn, Lynen, Mahr, Nöth, Schwab, Walcher, Wallenfels, Wiberg, Witt, Zimmermann.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990